

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR DE RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL PARA LA DETERMINACIÓN DE HORMONAS PITUITARIAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tesis para optar al grado de Doctor en Química

JUAN TREVIÑO CASTRILLO

Codirigida por Prof. Laura M. Lechuga y

Dr. José Miguel Rodríguez Frade

Presentada ante el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental
de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid



Llevada a cabo en el Centro de Investigación en Nanociencia y Nanotecnología
(CIN2: CSIC-ICN)



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



Madrid, Mayo de 2009

Índice

• Motivación y objetivos.....	7
• Estructura.....	11
1. Introducción.....	15
1.1. Las hormonas hGH, hTSH, hFSH y hLH y su determinación.....	15
1.1.1. El sistema endocrino y la glándula pituitaria.....	15
1.1.2. La regulación del sistema reproductor.....	16
1.1.3. La función tiroidea.....	18
1.1.4. La regulación del crecimiento.....	19
1.1.5. Determinación de las hormonas hTSH, hGH, hFSH y hLH.....	21
1.2. Inmunoensayos.....	25
1.3. Biosensores.....	30
1.4. Tipos de biosensores.....	36
1.4.1. Elemento de reconocimiento biológico.....	37
Biosensores catalíticos.....	38
Biosensores de afinidad.....	39
1.4.2. Transductores.....	41
Transductores ópticos.....	44
1.5. Biosensores de resonancia de plasmón superficial.....	52
1.5.1. Elementos de reconocimiento biológico y su inmovilización.....	59
1.5.2. Prevención de interacciones inespecíficas.....	63
1.5.3. Regeneración de la superficie del sensor.....	65
1.5.4. Formatos de ensayo.....	66
1.5.5. Aplicaciones de biosensores SPR.....	68
1.6. Referencias.....	71

2. Materiales y métodos.....	75
2.1. Descripción del biosensor de resonancia de plasmón superficial.....	75
2.2. Reactivos.....	78
2.3. Hormonas y anticuerpos.....	79
2.4. Formación de las SAM.....	81
2.5. Inmovilización de las hormonas.....	82
2.6. Inmunoensayo SPR de inhibición.....	83
2.7. Optimización de las condiciones de trabajo con muestras de fluidos biológicos.....	85
2.8. Inmunoensayo SPR de inhibición para la detección de hGH en suero.....	86
2.9. Inmunoensayo SPR para la detección simultanea de hFSH y hLH en orina.....	87
2.10. Inmunoensayo SPR para la detección de hTSH en muestras reales.....	88
2.11. Optimización de la inmovilización de anticuerpos.....	88
2.11.1. Inmovilización covalente.....	88
2.11.2. Inmovilización por captura.....	89
2.12. Referencias.....	92

3. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hGH en muestras de suero.....	93
3.1. Inmovilización de la hGH.....	93
3.2. Inmunoensayo de SPR para la determinación de hGH en PBST.....	98
3.3. Optimización de las condiciones de trabajo con muestras de suero.....	103
3.4. Inmunoensayo de SPR para la determinación de hGH en suero.....	114
3.4.1. Reproducibilidad.....	116
3.4.2. Reutilización.....	117
3.4.3. Comparación con el método ELISA. Análisis de muestras reales...	118
3.5. Conclusiones.....	119
3.6. Referencias.....	122
 4. Inmunoensayo multianalito SPR para la determinación de gonadotropinas en muestras de orina.....	 123
4.1. Inmovilización de las hormonas.....	123
4.2. Inmunoensayo multianalito SPR para la determinación de hFSH y hLH en PBST.....	127
4.2.1. Formato de inmovilización individual. Selección de anticuerpos...	127
4.2.2. Formato de inmovilización simultánea.....	132
4.3. Inmunoensayo multianalito SPR para la determinación de hFSH y hLH en orina.....	137
4.3.1. Reproducibilidad.....	143
4.3.2. Reutilización.....	144
4.4. Conclusiones.....	147
4.5. Referencias.....	149

5. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hTSH.....	151
5.1. Inmovilización de la hTSH.....	151
5.2. Inmunoensayo SPR para la determinación de hTSH en PBST.....	153
5.2.1. Selección de anticuerpos.....	153
5.3. Inmunoensayo SPR para la determinación de hTSH en muestras reales.....	158
5.4. Conclusiones.....	162
5.5. Referencias.....	164
 6. Estudio de estrategias para la inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR.....	 165
6.1. Inmovilización covalente.....	167
6.2. Inmovilización por captura.....	170
6.3. Conclusiones.....	183
6.4. Referencias.....	185
 • Conclusiones generales.....	 187
• Líneas de futuro.....	195
• Publicaciones.....	199

Motivación y Objetivos

Actualmente existe un interés en la descentralización del diagnóstico clínico hacia diferentes lugares de atención médica (POC: point-of-care) como centros de atención primaria, clínicas, unidades hospitalarias de urgencias, unidades de cuidados intensivos, quirófanos, ambulancias, lugares de trabajo e incluso nuestros propios hogares. Para ello es preciso desarrollar técnicas que permitan llevar a cabo cribas de pacientes de riesgo, con el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento del tratamiento y la vigilancia de la recurrencia de ciertas enfermedades en este tipo de emplazamientos. Los dispositivos biosensores constituyen una solución excepcional para cubrir estas necesidades.

Cualquier sistema de análisis POC debe reunir unas características esenciales, relacionadas con la calidad analítica, como son la exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad, junto a otras características prácticas como un tiempo de análisis corto, manejo sencillo, reducido mantenimiento y calibración, detección en tiempo real, directa y sin pretratamiento, portabilidad, automatización y conectividad. Aunque es muy difícil encontrar tecnologías que aglutinen todos estos exigentes requerimientos, los avances realizados en el área de los biosensores abren una vía de conseguir dispositivos ideales para los diferentes retos analíticos que suscita el campo de los tests POC.

Los biosensores de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) han demostrado su utilidad en la detección de analitos relacionados con el diagnóstico, como marcadores de cáncer, alergias, dolencias cardíacas, fármacos y hormonas. A pesar del gran esfuerzo dedicado al desarrollo de biosensores SPR no existen muchas aplicaciones que midan analitos de interés clínico en muestras reales a niveles de concentración adecuados y de forma rápida, con los mínimos pasos de pretratamiento o sin amplificación de la señal. Aunque se han realizado muchos progresos, aún no se ha conseguido la detección de un analito a niveles de concentración relevantes en suero sin necesidad de tratamiento previo.

Para este trabajo hemos escogido diversas hormonas de origen pituitario como modelo, debido a su gran interés biológico y a su utilidad para el diagnóstico de ciertos desórdenes. La glándula pituitaria es parte del sistema endocrino y regula numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo, mediante la secreción de diversas hormonas entre las que destacan la hormona estimulante folicular (hFSH), la hormona luteinizante (hLH), la hormona estimulante de la tiroides (hTSH) y la hormona del crecimiento (hGH). Existen diversos desórdenes relacionados con estas hormonas cuyo tratamiento podría verse beneficiado si se dispusiera de un método de diagnóstico que pudiera producir resultados inmediatos en los puntos de atención médica.

El objetivo general de este estudio de Tesis es el desarrollo de un inmunosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) capaz de determinar las hormonas pituitarias hTSH, hFSH, hLH y hGH a niveles de concentración fisiológicos. La medida se ha de llevar a cabo de forma rápida, sencilla, en tiempo real y sin necesidad de marcadores, directamente en orina y suero, con los mínimos pasos de pretratamiento y manejo de muestras. Mediante este estudio se intenta demostrar también la utilidad del biosensor SPR Sensia (desarrollado en nuestro grupo y comercializado por la empresa derivada de él, Sensia S.L.) para la determinación rápida y sencilla de analitos de interés clínico en muestras biológicas para el seguimiento de biomarcadores proteicos. Se intenta de esta manera probar la conveniencia de éste equipo como una nueva herramienta para el diagnóstico rápido en laboratorios clínicos y en puntos de atención médica.

En todos los ensayos desarrollados en este trabajo se ha de llevar a cabo:

- Estudio de las condiciones de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico de forma estable y controlada en la superficie del sensor.
- Elección de los anticuerpos más adecuados para el inmunoensayo SPR.
- Evaluación de la especificidad del biosensor.
- Estudio de las condiciones más adecuadas para el funcionamiento del inmunoensayo SPR.

- Optimización de las condiciones de trabajo con muestras biológicas para evitar los efectos producidos por la unión inespecífica de componentes de la matriz de la muestra.
- Estudio de la reutilización del dispositivo de forma que se mantenga su actividad intacta a lo largo de un elevado número de ciclos de medida y regeneración
- Evaluación de la variabilidad, tanto inter- como intra-ensayo, y entre diferentes chips sensores.

El primer objetivo específico de éste trabajo es demostrar la determinación de un analito clínico en suero de forma directa, sin dilución ni ningún tipo de tratamiento de la muestra. Para este propósito se ha elegido el inmunoensayo para la determinación hGH como un modelo, ya que podría proporcionar un valioso campo de aplicación para el diagnóstico de la deficiencia de hGH. El suero sanguíneo es una matriz muy valiosa clínicamente, ya que contiene miles de proteínas que proporcionan una amplia información, especialmente para la detección de biomarcadores de diferentes enfermedades. Las aplicaciones de biosensores SPR en suero son poco comunes y generalmente hacen uso de complejos procesos de pretratamiento o determinan analitos en altas concentraciones mediante un elevado grado de dilución de las muestras.

Otro de los objetivos establecido para este trabajo es la determinación de las hormonas hFSH y hLH en orina mediante inmunoensayo de SPR, que puede ser de utilidad para la determinación del periodo fértil, de la llegada de la menopausia y en el diagnóstico de enfermedades como el síndrome del ovario poliquístico y otras disfunciones gonadales. La orina, es una muestra biológica ideal para la determinación de biomarcadores de enfermedades ya que puede obtenerse en grandes cantidades, de forma simple y no invasiva, lo que es muy ventajoso para el diagnóstico, ya que permite tomar muestras de forma repetida durante periodos de tiempo prolongados.

La aplicación del inmunoensayo de SPR para la determinación de hTSH en sangre para el diagnóstico del hipotiroidismo congénito es otro de los objetivos de éste estudio, ya que supone la posibilidad de llevar a cabo una medida rápida, simple y en tiempo real ahorrando los pasos de tratamiento de la muestra, lo que permitiría obtener los resultados en unos minutos y sin necesidad de personal cualificado. La portabilidad

del dispositivo permitiría realizar medidas en el lugar de atención al paciente e incluso en campañas de cribado en zonas desfavorecidas en las que no se dispone de los medios adecuados para trabajar con las técnicas convencionales. En estos lugares, la posibilidad de efectuar éstos análisis cerca del paciente y obtener los resultados en el mismo momento podría tener un gran impacto en el tratamiento de los recién nacidos.

También se propone un nuevo enfoque para la determinación multianalito mediante el cual se lleva a cabo la coinmovilización de dos hormonas simultáneamente en la misma superficie sensora. Esta variación permite expandir la capacidad del dispositivo para la determinación de varios analitos diferentes en un solo ciclo de medida. Para ello es necesario encontrar las condiciones de coinmovilización adecuadas que permitan mantener una distribución apropiada de las dos hormonas en la superficie, consiguiendo así una sensibilidad similar a la del inmunoensayo individual para cada analito.

Finalmente, en este trabajo intentamos estudiar el efecto de diferentes factores para mejorar el proceso de inmovilización de los anticuerpos ya que, en general, las superficies funcionalizadas con anticuerpos muestran bajos rendimientos debido a la pérdida de actividad asociada a su inmovilización. El objetivo es alcanzar una densidad apropiada de los anticuerpos en la superficie y conseguir que se dispongan en una orientación adecuada, que permita que los sitios de reconocimiento antigénico presentes en la molécula se encuentren accesibles. De esta manera se puede alcanzar unas condiciones de inmovilización óptimas que produzcan una mayor proporción superficial de moléculas activas.

Estructura

La estructura de esta Tesis sigue el esquema siguiente:

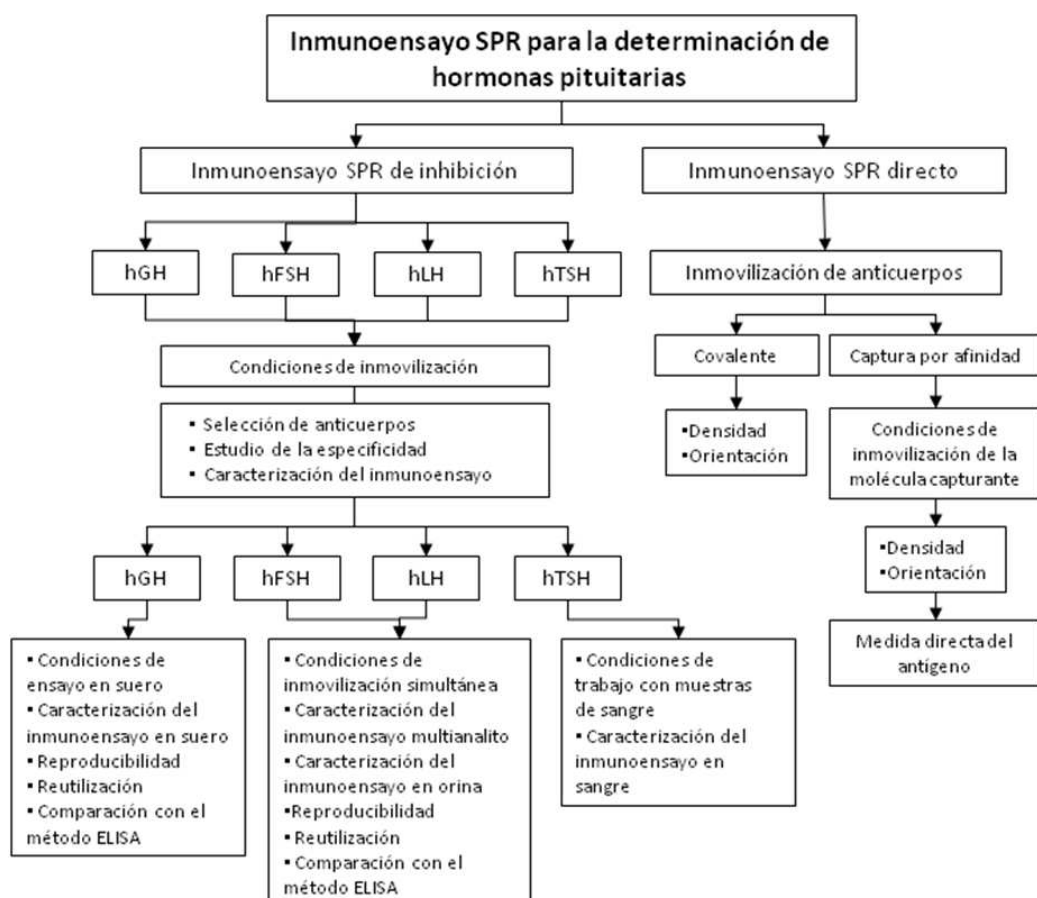
- **Capítulo 1. Introducción:** En este apartado se da una visión general de la importancia y la problemática de la determinación de las hormonas de origen pituitario. Posteriormente se presentan las diferentes técnicas biosensoras disponibles y sus aplicaciones, con especial énfasis en los biosensores ópticos de resonancia de plasmón superficial.
- **Capítulo 2. Materiales y métodos:** Se lleva a cabo una descripción detallada del dispositivo biosensor empleado. Se detallan también tanto los reactivos como las técnicas y protocolos para la consecución de los objetivos planteados.
- **Capítulo 3. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hGH en muestras de suero:** Se muestran los resultados obtenidos en el proceso de inmovilización de la hGH. Posteriormente se presentan los datos de la optimización y caracterización del inmunoensayo SPR de inhibición. Seguidamente se muestran las condiciones adecuadas para el funcionamiento del ensayo y se caracteriza el inmunoensayo de SPR utilizando muestras de suero .
- **Capítulo 4. Inmunoensayo multianálisis SPR para la determinación de gonadotropinas en muestras de orina:** Se muestran los resultados de los procesos de inmovilización de ambas hormonas gonadotrópicas, hFSH y hLH, de forma individual o simultánea. Seguidamente se presentan los datos de la optimización y la caracterización de los inmunoensayos SPR de inhibición individuales para la determinación de cada una de las hormonas. Posteriormente se presentan los resultados de los inmunoensayos para la determinación simultánea de ambas hormonas. Finalmente se muestran las condiciones adecuadas para la evaluación de

muestras de orina y la caracterización del inmunoensayo de SPR en esas condiciones.

- **Capítulo 5. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hTSH:**

Se muestran los resultados del proceso de inmovilización de la hormona hTSH y los datos de la optimización y la caracterización del inmunoensayos SPR de inhibición. Finalmente se muestran los resultados obtenidos al intentar establecer las condiciones adecuadas para el diagnóstico neonatal de hipotiroidismo congénito.

- **Capítulo 6. Estudio de estrategias para la inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR.** En este apartado se presentan los resultados del trabajo realizado para establecer las mejores condiciones de inmovilización de anticuerpos para llevar a cabo inmunoensayos de SPR directos como alternativa a los inmunoensayos de inhibición. Se muestran los resultados obtenidos utilizando las aproximaciones de inmovilización covalente y de captura por afinidad. También se presenta el estudio de la obtención de la densidad óptima de inmovilización y de la orientación de la biomolécula.



1. Introducción

1.1. Las hormonas hGH, hTSH, hFSH y hLH y su determinación

1.1.1. El sistema endocrino y la glándula pituitaria

El sistema endocrino está formado por diversas glándulas y tejidos que segregan sustancias biológicamente activas, denominadas hormonas (Fig. 1.1) que actúan como un sistema de comunicación celular. La interacción hormonal entre estas glándulas coordina el desarrollo y diferenciación del cuerpo humano y juega un papel muy importante en su mantenimiento estructural y su integridad funcional.

La glándula pituitaria es parte del sistema endocrino y regula numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento, la reproducción y el metabolismo. Mediante el control del hipotálamo, el lóbulo anterior de la pituitaria produce y segrega hormonas peptídicas como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), también conocida como tirotropina, la prolactina (PRL), la hormona del crecimiento (GH), la hormona estimulante folicular (FSH) y la hormona luteinizante (LH).

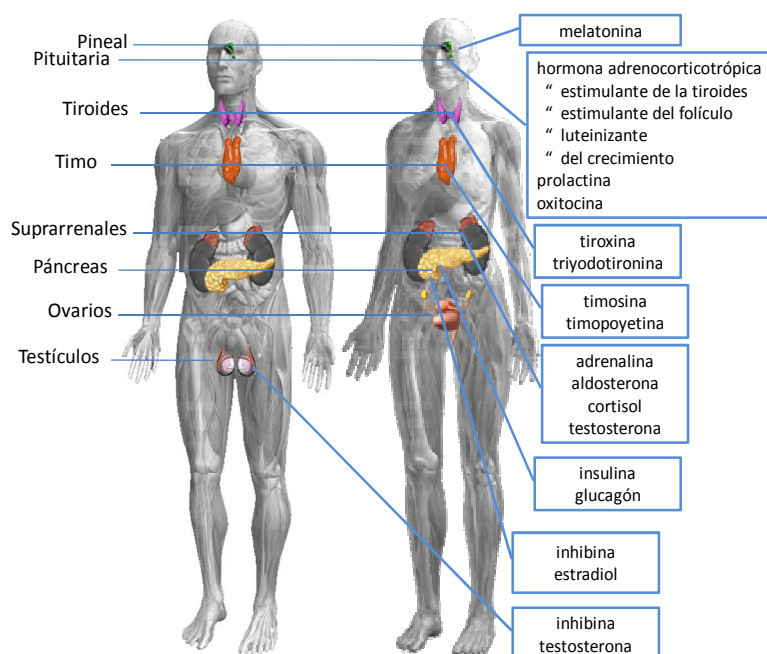


Fig. 1.1. Glándulas componentes del sistema endocrino y las principales hormonas que segregan

1.1.2. La regulación del sistema reproductor

El sistema reproductor humano está controlado por una compleja interacción entre numerosas hormonas (Fig. 1.2). En el sistema reproductor femenino, en particular, este control consiste en un balance hormonal muy preciso en el que los ciclos y las variaciones con la edad juegan un importante papel. Las hormonas implicadas en la reproducción pueden dividirse en dos tipos, hormonas peptídicas, como la hFSH y la hLH y hormonas esteroideas, como la testosterona y el estradiol. Mediante el estímulo del hipotálamo por medio de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la pituitaria anterior segrega las hormonas hFSH y hLH, llamadas gonadotropinas, que tienen efecto sobre las gónadas y controlan la producción de espermatozoides y óvulos. Las gonadotropinas también estimulan la proliferación de células gonadales que segregan hormona esteroidea como la testosterona y el estradiol, responsables del desarrollo y actividad del tracto reproductivo. Todo este proceso está controlado por un mecanismo de retroalimentación sobre la pituitaria y el hipotálamo.

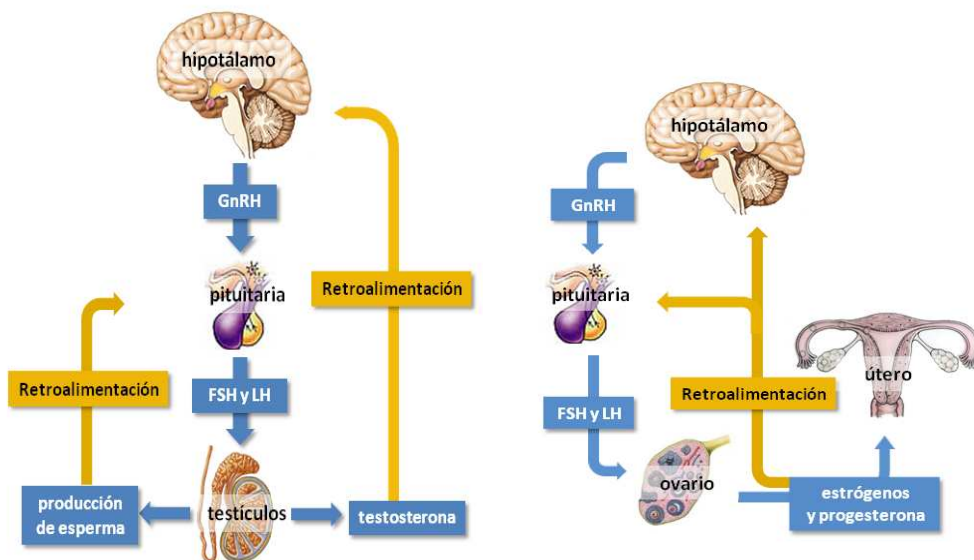


Fig. 1.2. Esquema de la regulación hormonal del sistema reproductor

En lo que se refiere al sistema reproductor masculino, la hLH y la hFSH son segregadas de forma constante y controlan la actividad de las células testiculares. Por un lado, la hLH estimula la producción de testosterona, necesaria para la producción y maduración de los espermatozoides. La testosterona controla a su vez los niveles de hLH mediante un mecanismo de retroalimentación. Por su parte, la hFSH estimula la producción de espermatozoides y su secreción es controlada mediante retroalimentación por la inhibina.

El sistema reproductor femenino presenta un comportamiento cíclico, denominado ciclo menstrual, que puede dividirse en varias fases. Durante la fase folicular, la hFSH activa el crecimiento de los folículos y el desarrollo del óvulo. Además, estimula la secreción de estrógenos e inhibina. Estos últimos controlan a su vez la secreción de hFSH mediante retroalimentación. Seguidamente, en la fase ovulatoria, la producción de estrógenos por parte del folículo genera un incremento de la secreción de hLH, que inhibe a su vez la producción de estrógenos y promueve la secreción de progesterona. Finalmente, en la fase lútea, si no se produce la fertilización se da paso a la menstruación. Durante esta fase, los niveles de progesterona y estradiol

bajan, por lo que comienza a producirse gradualmente de nuevo hFSH y hLH, lo que marca el comienzo de un nuevo ciclo. En el caso de producirse la fertilización y la implantación del embrión, tiene lugar la secreción de la gonadotropina coriónica (hCG) y el lactógeno placentario (hPL), que mantienen la producción de estrógenos y progesterona. Con la llegada de la menopausia, los niveles de esteroides bajan, perdiéndose el control de la secreción de hFSH y hLH por retroalimentación en el hipotálamo, por lo que los niveles de estas hormonas aumentan considerablemente.

Existen varias causas de infertilidad, como ciertas anomalías genéticas y lesiones en algún componente del eje formado por el hipotálamo, la pituitaria o las gónadas. La infertilidad masculina puede deberse tanto a fallos testiculares primarios o a hipogonadismo primario como a fallos testiculares secundarios debidos a insuficiencias de las gonadotropinas causadas por enfermedades del hipotálamo o la pituitaria. Por su parte, la infertilidad femenina puede estar causada por circunstancias físicas o desórdenes hormonales. El fallo ovárico puede deberse a un daño de la función del hipotálamo, de la pituitaria o a la incapacidad del ovario para reaccionar a la estimulación de las gonadotropinas. En todos los casos, es esencial poder determinar la causa subyacente de la infertilidad para poder aplicar el tratamiento adecuado. La medida de los niveles de las gonadotropinas en la circulación puede facilitar esta identificación. Si la causa es física se puede llevar a cabo un tratamiento de reproducción asistida y si la causa es hormonal se puede aplicar una terapia consistente en la administración de gonadotropinas. En ambos casos, se debe controlar los niveles hormonales para el seguimiento del tratamiento.

1.1.3. La función tiroidea

La glándula tiroides forma parte del sistema endocrino y regula el metabolismo a través de la producción de las hormonas tiroideas triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) en un proceso en el que el yodo tiene un papel central. La regulación de la función de la tiroides (Fig. 1.3) implica la estimulación de la secreción de la hTSH (también conocida como tirotropina) en la pituitaria por parte de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), procedente del hipotálamo. La hTSH estimula la producción de T_3 y T_4 en la tiroides, que a su vez controlan mediante retroalimentación la producción de hTSH.

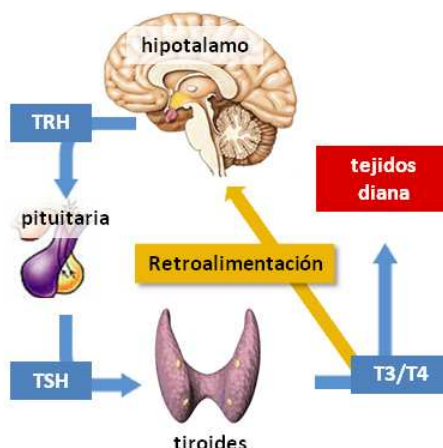


Fig. 1.3. Esquema de la regulación hormonal de la función tiroidea

Existen varios tipos de desórdenes relacionados con la glándula tiroides, entre los que se incluyen principalmente algunas disfunciones, desórdenes autoinmunes o su crecimiento anormal, conocido como bocio. Entre las disfunciones de la tiroides podemos diferenciar entre el hipertiroidismo, en el que se produce un incremento de la función tiroidea y de los niveles de hormonas T_3 y T_4 ; y el hipotiroidismo, en el que, de forma opuesta, se produce una reducción de la función tiroidea y un descenso de los niveles de estas hormonas. El diagnóstico correcto de los desórdenes tiroideos es de gran importancia, dada su elevada prevalencia, sobre todo en las mujeres. Además del examen de la glándula tiroides y del estudio del historial del paciente, la determinación de los niveles de las hormonas tiroideas T_3 y T_4 y de la hTSH son algunos de los métodos de diagnóstico más utilizados.

1.1.4. La regulación del crecimiento

La hGH es segregada por la pituitaria anterior en cantidades más grandes que cualquier otra hormona pituitaria. El control de su secreción (Fig. 1.4) lo lleva a cabo el hipotálamo mediante la liberación de péptidos estimulantes o inhibidores, aunque el proceso también se ve afectado por factores como el sueño, el ejercicio o la dieta. El efecto más evidente de la hGH es el crecimiento en altura durante la infancia. Este

crecimiento se produce por la estimulación directa que produce la hGH en el crecimiento de los extremos de los huesos y por la estimulación indirecta del crecimiento de gran variedad de tejidos. Además, la hGH regula diferentes procesos metabólicos a lo largo de toda la vida.

Existen algunos desórdenes relacionados con el exceso o la deficiencia de esta hormona. El exceso de hGH suele estar asociado a la presencia de un tumor en la pituitaria que origina un crecimiento gradual de la producción de hGH, lo que conduce a la enfermedad conocida como acromegalia. Cuando este tipo de tumores se producen en la infancia ocasionan un crecimiento excesivo conocido como gigantismo pituitario. La deficiencia de hGH es especialmente problemática en la infancia, ya que impide que se produzca un crecimiento normal. La causa de esta deficiencia suele ser genética o producida por daños en la pituitaria. El diagnóstico de la deficiencia de hGH suele incluir la determinación de los niveles de hGH en respuesta a estímulos sobre la glándula pituitaria.

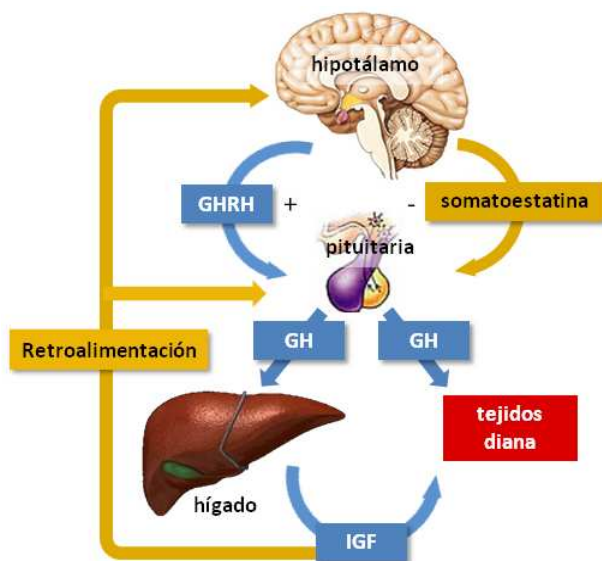


Fig. 1.4. Esquema de la regulación hormonal del crecimiento

1.1.5. Determinación de las hormonas hTSH, hGH, hFSH y hLH

Entre las hormonas de origen pituitario, en este trabajo de Tesis se han escogido la hTSH, hGH, hFSH y hLH debido que tienen un elevado interés biológico y a su utilidad para el diagnóstico de ciertos desórdenes, como se explicará más adelante. La hTSH, hLH y hFSH son hormonas polipeptídicas glicosiladas heterodiméricas, con pesos moleculares de alrededor de 30 kDa, formadas por una cadena alfa y una cadena beta. La cadena alfa es idéntica en estas tres hormonas y en la hormona gonadotropina coriónica (hCG). La cadena beta es única en cada hormona y le confiere su actividad biológica y diferenciación inmunológica [1].

La medida de la hTSH se utiliza en el diagnóstico de ciertos desórdenes tiroideos, ya que los niveles anormalmente elevados están asociados con el hipotiroidismo y tumores de la pituitaria, mientras los niveles bajos revelan hipertiroidismo o hipopituitarismo. Los valores normales de hTSH están en el intervalo de 0.4 a 4 $\mu\text{IU/mL}$ [2, 3], en unidades internacionales referidas a los estándares de la Organización Mundial de la Salud (WHO). La medida de hTSH se utiliza también en el diagnóstico de hipotiroidismo congénito en recién nacidos [2, 4], donde se establece un valor de corte de 20 $\mu\text{IU/mL}$ para la criba de pacientes. Se necesitan técnicas de diagnóstico muy sensibles para poder detectar los niveles de hTSH extremadamente bajos asociados a ciertos tipos de hipertiroidismo ($< 0.01 \mu\text{IU/mL}$), por lo que este tipo de diagnóstico ha constituido por mucho tiempo un reto para las técnicas analíticas. La sensibilidad de los ensayos de hTSH se ha visto mejorada enormemente en los últimos años. Los primeros ensayos, consistentes en radioinmunoensayos (RIA), presentaban límites de detección en el orden de las mIU/L. La introducción de los métodos inmunométricos (IMA), tanto inmunoradiométricos (IRMA) como inmunoenzimométricos (IEMA), inmunofluorimétricos (IFMA) e inmunoquimioluminométricos (ICMA) ha rebajado los límites de detección más de dos órdenes de magnitud, llegando a sensibilidades en el entorno de las $\mu\text{IU/L}$ [3]. Los diferentes tipos de inmunoensayo se detallarán más adelante en el apartado 1.2.

La determinación de la hormona hFSH es fundamental para la elucidación de la función reproductiva, la regulación de la fertilidad y el diagnóstico y tratamiento de desórdenes reproductivos. La medida de hFSH se emplea concretamente en el

diagnóstico de la infertilidad, tanto masculina como femenina, de la pubertad prematura o tardía, de la reserva ovárica o de la llegada de la menopausia [5]. También es de gran utilidad en el seguimiento de la respuesta al tratamiento de fertilidad. Los valores normales de hFSH se hallan en el intervalo de 2 – 10 mIU/mL, con incrementos en las mujeres de hasta 20 mIU/mL previos a la ovulación y hasta 100 mIU/mL tras las menopausia. Los valores son también elevados cuando la función de las gónadas está disminuida y se observan valores reducidos cuando existe algún problema en la pituitaria o el hipotálamo.

La determinación de hLH es importante para la detección de disfunciones en la pituitaria o las gónadas, la detección de desórdenes reproductivos y para el seguimiento de tratamientos de contracepción. Los valores normales de hLH se observan en el intervalo de 2 – 10 mIU/mL, con incrementos en las mujeres de hasta 100 mIU/mL previos a la ovulación y hasta 70 mIU/mL tras las menopausia. Los valores que exceden estos niveles en la mujer están asociados con la disfunción gonadal primaria, síndrome de ovario poliquístico, postmenopausia y adenoma pituitario. En el hombre, además de en casos de hipogonadismo, se pueden observar concentraciones elevadas de hLH en el síndrome de Klinefelter y en el fallo testicular primario [6]. La medida de hLH se utiliza como indicador del estado endocrino y en el control de la terapia hormonal.

La medida conjunta de hFSH y hLH se lleva a cabo de forma rutinaria para la determinación del estado de esterilización, de la probabilidad de ovulación, el diagnóstico de desórdenes reproductivos y el seguimiento de la terapia endocrinológica. En ambos casos, al igual que para la determinación de hTSH, los primeros ensayos consistían en ensayos RIA. Posteriormente, con la llegada de los métodos IMA, comenzaron a usarse tanto ensayos IFMA, como ICMA, que permiten llegar a límites de detección en el orden de las μ IU/mL. Los métodos de inmunoensayo enzimático (ELISA) permiten llevar a cabo medidas con una sensibilidad en el orden de las mIU/mL, suficiente para una gran parte de las aplicaciones diagnósticas [5, 6].

La hGH, a diferencia de las hormonas anteriores, es una hormona polipeptídica no glicosilada. La hGH en circulación es una mezcla compleja de diferentes formas moleculares [7] entre las que la isoforma mayoritaria hGH 22 kDa constituye alrededor de un 50 %, la hGH 20 kDa alrededor de un 10 % y el resto lo forman otras formas

minoritarias, dímeros y oligómeros, cuya importancia clínica aún no está clara. Además, aproximadamente la mitad de la hGH en la circulación está unida a la proteína de unión a GH (GHBP). La secreción de hGH por parte de la pituitaria es pulsátil, con pulsos cada 2-3 horas y niveles bajos de secreción entre pulsos. Como consecuencia de este patrón de secreción, los niveles de hGH en sangre fluctúan ampliamente, con máximos de 50-100 ng/mL y mínimos por debajo de 0.03 ng/mL [8, 9]. El diagnóstico de los desórdenes en la secreción de hGH se apoya en la determinación de hGH en suero durante el transcurso de tests dinámicos. Para el diagnóstico de la deficiencia de hGH se acepta un nivel de corte de < 10 ng/mL en respuesta a un test de estimulación apropiado. Los primeros inmunoensayos para la determinación de hGH consistían en radioinmunoensayos (RIA) competitivos y presentaban límites de detección del orden de ng/mL. Posteriormente se desarrollaron ensayos inmunoradiométricos (IRMA) [10]. Los ensayos de fase sólida de tipo sándwich IFMA, ICMA y ELISA son actualmente los más utilizados. Los ensayos más sensibles dentro de este tipo llegan a límites de detección de pg/mL [11, 12].

Además del diagnóstico de los desórdenes en la secreción de hGH, existe una aplicación potencial en medicina del deporte, ya que en los últimos años se está usando la hGH como sustancia de dopaje para aumentar el rendimiento deportivo. El dopaje con hGH se lleva a cabo mediante la administración de hGH recombinante (rhGH), que está formada únicamente por hGH 22 kDa. Debido a esto, podrían usarse ensayos específicos que diferencien la proporción de las isoformas para detectar la administración de hGH [13, 14].

Un método ideal de determinación de cualquiera de estas hormonas debería reflejar su actividad biológica, demostrar una elevada exactitud y reproducibilidad, utilizar un pequeño volumen de muestra, hacer uso de un diseño experimental simple, que permita llevar a cabo medidas de rutina, y con capacidad para procesar un elevado número de muestras [8]. Debido a la coexistencia de concentraciones muy próximas de estas hormonas en los fluidos biológicos, es necesario que el método de determinación presente una elevada especificidad, que permita diferenciar estas hormonas, algunas de las cuales son muy similares estructuralmente.

Tabla 1.1. Intervalos de referencia para las hormonas implicadas en el estudio

$\mu\text{IU/mL}$ pM			ng/mL pM		
hTSH			hGH		
normal	0.4 – 4	2 – 20	normal	0.03 – 100	1.4 – 4545
hipotiroidismo	20	100	deficiencia	10	454
mínimo	< 0.01	0.05			
mIU/mL pM			mIU/mL pM		
hFSH			hLH		
normal	2 – 10	4 – 20	normal	2 – 10	8 – 40
ovulación	5 – 20	10 – 40	ovulación	20 – 100	85 – 400
post- menopausia	30 - 100	60 – 200	post-menopausia	20 – 70	85 – 290

Los bioensayos proporcionan una medida de la actividad biológica, pero no son suficientemente sensibles y precisos. Además son, lentos y complejos. Aunque los avances más recientes en bioensayos consiguen un mejor funcionamiento, la necesidad de instalaciones, su laboriosidad y alto coste hacen que sean difíciles de aplicar para la medida rutinaria. Sin embargo, los bioensayos son de gran utilidad en la estandarización de preparaciones de estas hormonas y en la calibración de productos terapéuticos.

Los inmunoensayos proporcionan una medida de la concentración de hormona inmunoreactiva sin tener en cuenta su actividad biológica, pero cumplen todas las demás características, por lo que constituyen los métodos más extendidos para el diagnóstico clínico rutinario. En el caso de los inmunoensayos que hacen uso de marcadores radiactivos, existen algunas desventajas como la peligrosidad de estos reactivos y sus residuos y el alto coste del equipamiento, que limitan la extensión de su aplicación rutinaria. Los inmunoensayos enzimométricos, fluorimétricos y quimioluminométricos evitan las desventajas de los radiométricos y alcanzan los mejores niveles de sensibilidad. Los resultados proporcionados por los diferentes inmunoensayos son muy heterogeneos [2, 3, 5, 6, 8, 9, 15], principalmente debido a la propia heterogeneidad de estas hormonas en la circulación, ya que presentan una amplia

diversidad de isoformas, que hace que diferentes anticuerpos se unan a un diferente espectro de las mismas.

El tratamiento de los desórdenes anteriormente mencionados podría verse beneficiado al disponer de un método de diagnóstico que pudiera producir resultados inmediatos en los puntos de atención médica (POC: point-of-care) [16]. Los biosensores constituyen una herramienta ideal para éste tipo de aplicaciones, ya que pueden alcanzar unas características analíticas similares a las de algunos inmunoensayos, pero ofrecen ventajas adicionales como una rápida respuesta, portabilidad, manejo sencillo y automatización [17, 18]. Las características de estos dispositivos se explican en profundidad en el punto 1.3.

1.2. Inmunoensayos

Los inmunoensayos son técnicas analíticas que utilizan anticuerpos como detectores bioquímicos de la presencia de un analito en una muestra. Los anticuerpos son glicoproteínas de gran tamaño (~150 kDa) de la clase de las inmunoglobulinas (Ig), producidas por los linfocitos B y utilizadas por el sistema inmune de los vertebrados para identificar y neutralizar agentes extraños en el organismo, conocidos como antígenos, con el fin de facilitar su eliminación. La estructura básica de un anticuerpo se muestra en la Figura 1.5. Están formados por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos cadenas idénticas ligeras (L) unidas entre sí por medio de enlaces disulfuro. Las cadenas pesadas y ligeras se organizan en una parte variable (VH y VL) y una parte constante (CH y CL). Aunque la región invariable supone el 90% del peso del anticuerpo, el sitio de unión del antígeno está formado por la asociación de cadenas pesadas y ligeras de la zona variable situadas en la zona amino temporal. Funcionalmente, podemos distinguir dos porciones en los anticuerpos, la implicada en la unión al antígeno denominada Fab y la porción Fc, por la que se une a otras proteínas o receptores celulares. Existen varias clases diferentes de anticuerpos, que se diferencian por una serie de cambios estructurales que les confieren diferentes funciones en el organismo, que se denominan IgG, IgM, IgE, IgA e IgD. Los más

utilizados en inmunoensayos son las IgG de las subclases IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ y las IgM.

La interacción inmunológica se produce debido a la distribución espacial complementaria entre el antígeno y el anticuerpo. Esta unión es de tipo no covalente y presenta una elevada afinidad y selectividad, que viene determinada por el perfecto ajuste conformacional entre ambas moléculas. La región del antígeno que es reconocida específicamente por el anticuerpo se denomina determinante antigénico o epítipo. La afinidad del anticuerpo por el antígeno se debe a la combinación de fuerzas físicas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, uniones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, mientras que la especificidad del anticuerpo depende de su afinidad relativa por el antígeno y del número de interacciones químicas que se produzcan entre el antígeno y los sitios de unión del anticuerpo. La especificidad del anticuerpo puede dar lugar a fenómenos de reactividad cruzada si éste presenta afinidad en diferentes grados para más de un antígeno. La naturaleza del proceso de unión antígeno-anticuerpo es la que va a determinar la selectividad y sensibilidad del inmunoensayo.

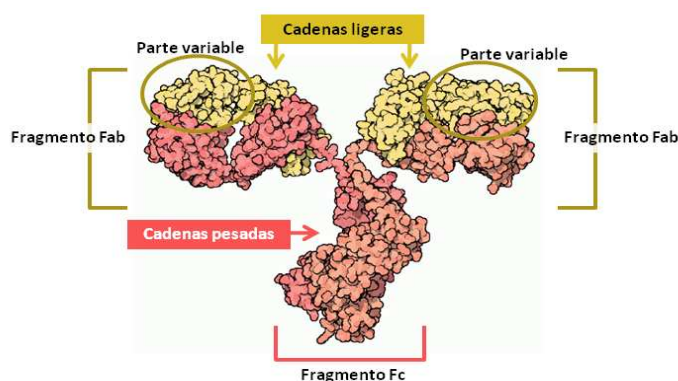


Figura 1.5. Estructura básica de un anticuerpo

El proceso de producción de anticuerpos es complejo y se desarrolla en varias etapas. En primer lugar, en el proceso conocido como inmunización, se introduce en el organismo del animal la sustancia frente a la cual se quieren obtener anticuerpos. La inmunización suele realizarse en animales de sangre caliente, como conejos, ovejas, pollos y ratones. Posteriormente, tras unos días, se extrae sangre del animal y se aíslan los anticuerpos del suero.

Los anticuerpos que se obtienen pueden ser policlonales o monoclonales, según la técnica de inmunización empleada. Los policlonales contienen una mezcla de diferentes poblaciones de anticuerpos, procedentes de diferentes clones de linfocitos B, que reconocen diferentes epítomos del antígeno, cada uno con diferente afinidad y especificidad. El inconveniente de este tipo de anticuerpos es que no permiten producir un gran suministro y el antisuero policlonal puede variar de una animal a otro.

Los anticuerpos monoclonales son específicos para un solo epítipo y son producidos por un único linfocito B y sus clones. La producción de este tipo de anticuerpos no fue posible hasta el año 1975, con el desarrollo de la técnica de hibridoma por parte de Kohler y Milstein [19], trabajo que les condujo a la obtención del Premio Nobel de Medicina en 1984. Mediante ésta técnica es posible producir poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno. El primer paso consiste en la inmunización de un ratón con el antígeno, al que posteriormente se le extraen linfocitos B. Los linfocitos B mueren tras pocos días en cultivo *in vitro*, de tal manera que para obtener una fuente continuada de anticuerpos, se fusionan con células inmortales de tumores de la médula ósea, llamados mielomas. Estas células híbridas, conocidas como hibridomas, se seleccionan y se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos. Todos los anticuerpos que procedan de la misma línea celular de hibridoma van a mantener constantes sus características de afinidad y su producción podría asegurarse de forma ilimitada. El único inconveniente es que la producción de anticuerpos monoclonales es dificultosa y requiere periodos más largos de tiempo, aunque los anticuerpos obtenidos son, en muchas ocasiones, más específicos y presentan menor reactividad cruzada que los policlonales. Una forma alternativa de producir anticuerpos consiste en el uso de técnicas de genética molecular, que permiten obtener fragmentos de anticuerpos recombinantes a partir de sistemas huésped simples como levaduras, plantas, células de insectos o bacterias.

El primer inmunoensayo desarrollado fue el radioinmunoensayo para la detección de insulina en muestras de sangre descrito por Berson y Yalow en 1959 [20], trabajo que les valió la concesión del Premio Nobel de Medicina en 1977. Desde entonces los inmunoensayos han evolucionado enormemente, han adquirido un papel

prominente en el laboratorio clínico y son esenciales en el análisis de muchas sustancias de interés clínico como proteínas, hormonas y fármacos.

Para estimar el resultado de la interacción entre el antígeno (Ag) y el anticuerpo selectivo (Ab) es necesario medir la señal producida por medio de un marcador, generalmente enzimático, radioactivo, luminiscente o fluorescente. Los inmunoensayos pueden clasificarse en homogéneos y heterogéneos. Los últimos requieren un paso extra para separar el complejo Ab-Ag formado, generalmente en fase sólida. Otro de los criterios empleados para clasificar los inmunoensayos es la división en competitivos y no competitivos [21].

Los inmunoensayos competitivos directos son aquellos que utilizan una concentración limitante de anticuerpo, por lo que los analitos de la muestra compiten con los antígenos marcados por los sitios de unión de los anticuerpos (Fig.1.6.a). La señal obtenida al detectar los antígenos marcados es inversamente proporcional a la concentración de analito. En el formato competitivo indirecto se utilizan anticuerpos marcados. En este caso los antígenos compiten con los analitos de la muestra por los anticuerpos (Fig.1.6.b). La señal obtenida también es inversamente proporcional a la concentración de analito añadido. Según el tipo de marcador utilizado en cada caso, los inmunoensayos competitivos pueden denominarse radioinmunoensayos (RIA), enzimoimmunoensayos (EIA), fluoroinmunoensayos (FIA) o quimioluminoinmunoensayos (CLIA).

El descubrimiento del proceso de producción de anticuerpos monoclonales en 1975 hizo posible la obtención de grandes cantidades de anticuerpos, lo que condujo al desarrollo de los inmunoensayos no competitivos. Los inmunoensayos no competitivos son aquellos que utilizan concentraciones en exceso de los reactivos. Se utilizan anticuerpos no marcados a los que se une el analito. Posteriormente, para determinar los analitos que han interaccionado se introduce un anticuerpo marcado que se une al analito y da lugar a una interacción tipo sándwich (Fig.1.6.c). Para ello el antígeno debe disponer de dos sitios de unión diferenciados. En este caso, se obtiene una señal que es proporcional a la concentración de analito. Según el tipo de marcador utilizado, los inmunoensayos no competitivos se denominan inmunoradiométricos (IRMA),

inmunofluorimétricos (IFMA), inmunoquimioluminométricos (ICMA) y ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA).

Los radioisótopos fueron los marcadores usados en los primeros inmunoensayos y durante mucho tiempo fueron los más sensibles. Otros marcadores como las enzimas, los fluoróforos y la polarización de fluorescencia, proporcionan ventajas técnicas y de seguridad frente a los radioisótopos, pero generalmente no son tan sensibles. Solamente el uso de marcadores quimioluminiscentes alcanza e incluso supera la sensibilidad de los radiomarcadores, por lo que su uso se ha generalizado en los últimos años en la mayor parte de los analizadores modernos de inmunoensayo automáticos [22].

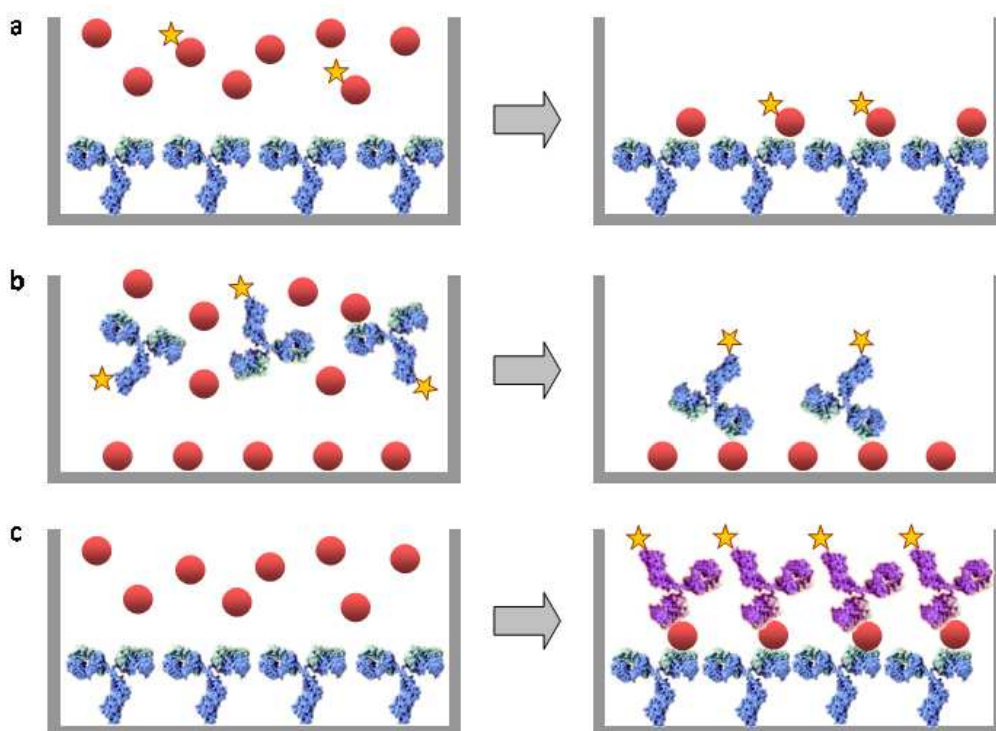


Fig. 1.6. Tipos de inmunoensayos más frecuentes: a) ensayo competitivo directo; b) ensayo competitivo indirecto; c) ensayo sándwich.

La reciente aparición de los dispositivos biosensores basados en los principios de los inmunoensayos, conocidos como inmunosensores, presenta atractivas ventajas y estimulantes retos que comentaremos en profundidad en el siguiente apartado.

1.3. Biosensores

Los organismos biológicos se encuentran entre los sistemas más eficientes y, en concreto, su capacidad para el reconocimiento de sustancias externas es insuperable. El uso de receptores biológicos en química analítica permite aprovechar su aptitud como sistemas de reconocimiento. La combinación de este tipo de elementos de reconocimiento biológico con una amplia variedad de sistemas de transducción ha abierto la puerta a un campo en rápida expansión como es el de los biosensores [23]. Un biosensor se define como un dispositivo analítico compuesto por un elemento de reconocimiento biológico, capaz de reconocer un analito, en contacto íntimo con un transductor físico-químico capaz de generar una respuesta proporcional a la concentración de ese analito. Como resultado de la interacción específica del elemento de reconocimiento biológico con el analito, se produce un cambio físico-químico que el transductor convierte en una señal medible [24].

En la Figura 1.7 se muestra el esquema básico de funcionamiento de un biosensor. Las características únicas de este tipo de dispositivos vienen determinadas por la selectividad proporcionada por el elemento de reconocimiento biológico y la sensibilidad conseguida mediante un mecanismo de transducción adecuado. Podemos comprender, por tanto, que el comportamiento químico de la interfase interna entre el elemento de reconocimiento biológico y el transductor sea de una importancia crucial en el desarrollo de este tipo de sistemas.

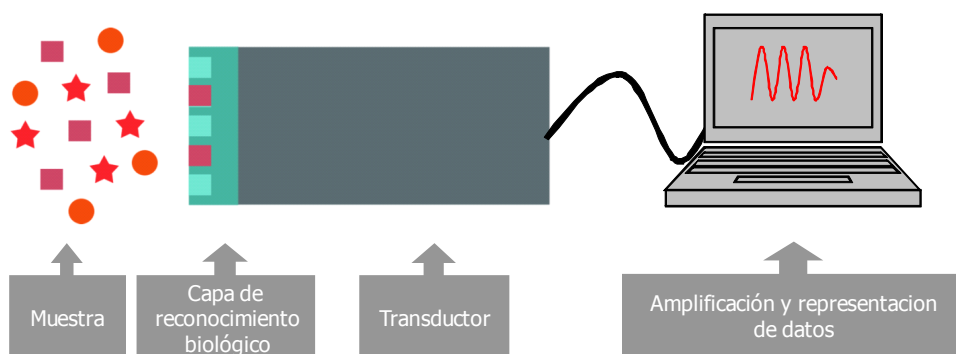


Fig. 1.7. Configuración básica de un biosensor

Las dos características más importantes de un biosensor son la sensibilidad y la selectividad. Además de estas dos características esenciales, los biosensores presentan muchas otras entre las que destacan:

- una elevada fiabilidad y estabilidad, que le otorgue un tiempo de vida largo,
- versatilidad, que permite seleccionar diferentes receptores biológicos para determinar diferentes analitos o grupos de analitos,
- capacidad de miniaturización, para poder desarrollar dispositivos portátiles que lleven a cabo medidas in situ,
- posibilidad de realizar multi-análisis simultáneos,
- bajo coste de producción, que permita su desarrollo comercial,
- tiempo de análisis bajo,
- mínimo pretratamiento de muestra,
- reducido volumen de muestra,
- manejo sencillo, que permita su uso por usuarios no especializados,
- capacidad de automatización, para poder integrarlos en procesos industriales o estaciones de medida.

Aunque es difícil conseguir dispositivos que cumplan todas estas características, algunos de los biosensores desarrollados hasta el momento reúnen muchas de ellas, por lo que presentan numerosas ventajas respecto a las técnicas analíticas convencionales.

El primer biosensor, conocido entonces como electrodo enzimático, fue propuesto por Clark y Lyons [25] en 1962 y desarrollado por Updicke y Hicks [26] en 1967 para la detección de la glucosa. El acoplamiento de la enzima glucosa oxidasa a un electrodo amperométrico de oxígeno permitía la detección de glucosa en sangre. Este trabajo culminó en 1975 con la presentación del primer analizador de glucosa en sangre por parte de la empresa Yellow Springs Instruments (Ohio, EEUU). Desde entonces, el desarrollo de biosensores tanto desde el punto de vista científico como comercial, ha mostrado una progresión constante.

En la construcción de biosensores, se han de considerar diferentes aspectos que incluyen no solo a los referidos al transductor y al elemento de reconocimiento biológico, sino también al diseño de sistemas de fluídica, la química de inmovilización

de biomoléculas en la superficie del sensor, el formato de los ensayos y el análisis de los datos. La naturaleza multidisciplinar de este tipo de dispositivos les ha convertido en un punto de encuentro de diferentes áreas de conocimiento científico y tecnológico. Debido a esto, el desarrollo de biosensores basados en diversos tipos de transductores y elementos de reconocimiento biológicos, se ha visto impulsado en los últimos años por los avances en diversos campos entre los que cabe destacar la biología molecular, ciencia y tecnología de materiales, microelectrónica, micro-fabricación, nanotecnología y biotecnología.

Tabla 1.2. Principales aplicaciones de los biosensores

Diagnóstico clínico		Control medioambiental	
Vigilancia intensiva	glucosa urea lactato	Contaminantes orgánicos	Fenoles PCBs PAHs
Alergias	IgE	Metales pesados	Zinc Mercurio
Infecciones Bacterianas	Salmonella E. Coli	Plaguicidas	Organofosforados Carbamatos
Infecciones víricas	Hepatitis B HIV	Patógenos	BOD
Toxinas	SEB Botulina	Industria alimentaria	
Enfermedades cardíacas	Mioglobina cTnl/T	Calidad alimentaria	Azúcares Etanol
Seguimiento de fármacos	teofilina	Seguridad alimentaria	Alérgenos Patógenos
Drogas ilegales	cocaína	Procesos industriales	Fermentación
Control endocrino/reproductivo	hCG estradiol	Seguridad	
Detección temprana de cáncer	PSA BRCA-1	Bacterias	Ántrax Neumonía
Industria farmacéutica		Toxinas	Cólera Botulismo
Descubrimiento de nuevos fármacos		Virus	Viruela

Aunque es el campo clínico en el que más aplicaciones de los biosensores se han desarrollado, también hay que tener en cuenta su utilidad en otros campos como el medioambiental, la industria agroalimentaria y farmacéutica e incluso en seguridad y defensa. Como se puede observar en la Tabla 1.2, esta tecnología ha suscitado un gran interés en las áreas mencionadas, lo que ha ocasionado la aparición de un amplio abanico de aplicaciones.

El primer concepto y comercialización de un biosensor fue un biosensor clínico de glucosa para el seguimiento de la diabetes. Desde entonces, la investigación, aplicación y comercialización de biosensores no ha parado de crecer y el campo del diagnóstico clínico ha sido siempre el más productivo. Pese a esto, la comercialización de biosensores se encuentra en este ámbito con la competencia de un gran número de equipos de diagnóstico altamente automatizados, por lo que los biosensores deben ofrecer características novedosas como rapidez, portabilidad, bajo coste y un manejo sencillo. Además, se deben definir las aplicaciones clínicas en las que pueden ofrecer ventajas respecto a las técnicas establecidas en los laboratorios centrales de los hospitales. Sólo si se tiene claro qué técnicas pueden tener una utilidad clínica real podrá darse el salto hacia la aplicación y la comercialización [27].

Actualmente, existe un interés en la descentralización del diagnóstico clínico [17] hacia diferentes lugares de atención médica (POC: point-of-care) como centros de atención primaria, clínicas, unidades hospitalarias de urgencias y cuidados intensivos, quirófanos, ambulancias, lugares de trabajo, en nuestros propios hogares e incluso en localizaciones tan remotas como operaciones militares y misiones espaciales [16]. Existe, por tanto, una necesidad de técnicas que permitan llevar a cabo cribas de pacientes de riesgo, el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento del tratamiento y la vigilancia de la recurrencia de ciertas enfermedades en este tipo de emplazamientos. Los biosensores constituyen una solución excepcional para cubrir estas necesidades, sobre todo en los casos en los que pueden tener impacto inmediato en el cuidado del paciente, reducir el número de hospitalizaciones, y la frecuencia de consultas médicas, consiguiendo así una mejor atención con un menor coste para el sistema sanitario.

Cualquier sistema de análisis POC debe reunir unas características esenciales, como son:

- las relacionadas con la calidad analítica, que debe demostrar cualquier tipo de técnica en este campo: como la exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad, poniendo un especial interés en la fiabilidad de las medidas, de forma que sea posible tomar decisiones sin el apoyo de técnicas de laboratorio.
- características prácticas como un tiempo de análisis corto, un manejo sencillo, con reducido mantenimiento y calibración, detección en tiempo real, directa y sin pretratamiento, portabilidad, automatización y conectividad, que permita transferir inmediatamente los datos a los sistemas de gestión de la información médica.

Aunque es muy difícil encontrar tecnologías que aglutinen todos estos exigentes requerimientos, los avances realizados en el área de los biosensores están en el camino de conseguir dispositivos ideales para los diferentes retos analíticos que suscita el campo de los tests POC.

Los campos más destacados en el diagnóstico POC [16] se agrupan en la Tabla 1.2. Puede encontrarse amplia información sobre todas estas aplicaciones en varias excelentes revisiones [17, 18, 28-30].

La necesidad de diagnosticar y gestionar la enfermedad de la diabetes mellitus ha sido uno de los impulsos principales para el desarrollo de biosensores. Los biosensores para la detección de glucosa han sido los más estudiados y comercializados ya que el mercado para este tipo de sistemas es enorme. Estos dispositivos se usan tanto en laboratorio clínicos tradicionales, como en diferentes lugares de atención médica y para el auto-seguimiento de los propios pacientes. Mediante tecnologías similares se puede detectar, además de glucosa, analitos como lactato, urea y creatinina, que pueden integrarse en sistemas de cuidado intensivo que incluyen medidas de gases y electrolitos en sangre [17].

Otros analitos clínicos que también ha suscitado un gran interés desde los primeros momentos en el desarrollo de biosensores son la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el antígeno específico prostático (PSA) para cuya detección se han construido todo tipo de dispositivos [17], sobre todo inmunosensores, tanto electroquímicos como ópticos, en modo de medida directo o utilizando marcadores. La

detección de hCG tiene interés para el seguimiento endocrinológico y reproductivo y para la detección de ciertos tipos de cáncer, mientras que el PSA es un marcador muy útil para la criba y seguimiento de pacientes con cáncer de próstata.

El creciente número de contaminantes presentes en el medio ambiente hace necesarias nuevas técnicas rápidas y baratas que permitan llevar a cabo su seguimiento in situ. Las técnicas tradicionales no reúnen las características necesarias para esta finalidad, por lo que los biosensores se revelan como una alternativa muy adecuada. Aunque aún requiere mejoras, esta tecnología ha alcanzado un funcionamiento práctico muy satisfactorio para la determinación, en muestras reales y con el mínimo tratamiento de muestra, de contaminantes como compuestos fenólicos, bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), metales pesados, demanda biológica de oxígeno (BOD) y algunos plaguicidas. En algunos casos sus resultados han sido validados por comparación con los métodos estándar [31].

En cuanto a la industria alimentaria [32, 33], existe una necesidad de evaluación periódica de ciertos parámetros que las técnicas convencionales no pueden cubrir, ya que no permiten llevar a cabo un seguimiento rápido y continuo para el que los biosensores pueden resultar muy ventajosos. La aplicación de estos dispositivos puede ser de especial interés en áreas como:

- calidad alimentaria:
 - composición de los productos: contenido en azúcares, etanol, vitaminas, aminoácidos o colesterol
 - estado de conservación de los alimentos
 - compuestos aromáticos
 - control de procedencia
- seguridad alimentaria:
 - contaminantes como antibióticos, hormonas y plaguicidas
 - toxinas y alérgenos
 - organismos patógenos
 - componentes obtenidos de organismos genéticamente modificados (GMOs)
- seguimiento en línea de procesos de transformación

En el caso de la industria farmacéutica, el uso de biosensores es de gran interés para el descubrimiento de nuevos fármacos [34, 35]. Aunque las tecnologías utilizadas tradicionalmente tienen una extraordinaria capacidad para ensayar un número enorme de sustancias, los biosensores pueden generar una información de gran calidad, ya que permiten detectar potenciales ligandos que interaccionen con ciertos receptores celulares, obtener información sobre su mecanismo de acción a través de la afinidad y la cinética de la interacción así como de los perfiles farmacocinéticos que describen su absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad.

Por último, el campo de la defensa y seguridad, es uno de los últimos que está aplicando las tecnologías de los biosensores [36]. La utilización en las últimas décadas de agentes químicos y biológicos como armas ha suscitado una alarma en la población, no siempre injustificada, y ha motivado que ciertos gobiernos hayan mostrado su interés y financiado la investigación en técnicas que permitan la detección temprana de este tipo de ataques. En concreto, algunos de los agentes más estudiados son bacterias como las del ántrax, la neumonía o la tularemia; toxinas, como las del cólera y el botulismo y virus como el de la viruela. Hay que tener en cuenta que estas sustancias pueden encontrarse tanto en el agua como en el aire, en la comida o en las propias personas. Los retos más importantes que deben alcanzar los biosensores en este campo son la mejora tanto de los mecanismos de muestreo del aire como de su sensibilidad y tiempo de respuesta.

1.4. Tipos de biosensores

La clasificación de los biosensores está determinada por las propiedades de sus dos componentes fundamentales, la naturaleza del elemento de reconocimiento biológico y el tipo de transductor empleado [37]. Existe una amplia gama tanto de elementos de reconocimiento como de sistemas de transducción, que proporcionan múltiples combinaciones disponibles para la fabricación de biosensores. Las características del analito para el que se diseña el dispositivo van a determinar la elección del elemento de reconocimiento biológico. Así mismo, la elección del elemento de reconocimiento biológico y su interacción con el analito van a establecer

que variaciones se van a producir en las propiedades físico-químicas y, por tanto, que tipo de transductor va a ser el más adecuado. En la Tabla 1.3 se recoge una clasificación general de los biosensores con ejemplos de cada uno de los tipos que se explicarán en profundidad a continuación.

Tabla 1.3. Clasificación de los biosensores

Elemento de reconocimiento biológico		Transductor	
Catalíticos	Enzimas	Electroquímicos	Amperométricos
	Células/Orgánulos		Potenciométricos
	Tejidos		Conductimétricos
			Impedimétricos
Afinidad	Anticuerpos	Ópticos	Fibra óptica
	Receptores		TIRF
	Ácidos nucleicos		SPR
	Interferómetros (onda evanescente)		
Afinidad-Biomiméticos	MIPs	Piezoeléctricos	QCM
	Aptámeros	Nanomecánicos	Micropalanca

1.4.1. Elemento de reconocimiento biológico

Los biosensores pueden dividirse, en cuanto al elemento de reconocimiento utilizado y el tipo de interacción que se establece con el analito, en dos grandes categorías.

- Biosensores catalíticos: en los que tras el proceso de reconocimiento se produce una reacción que transforma el analito y hace posible su detección.
- Biosensores de afinidad: en los que se hace uso de la capacidad del elemento de reconocimiento biológico para unirse al analito.

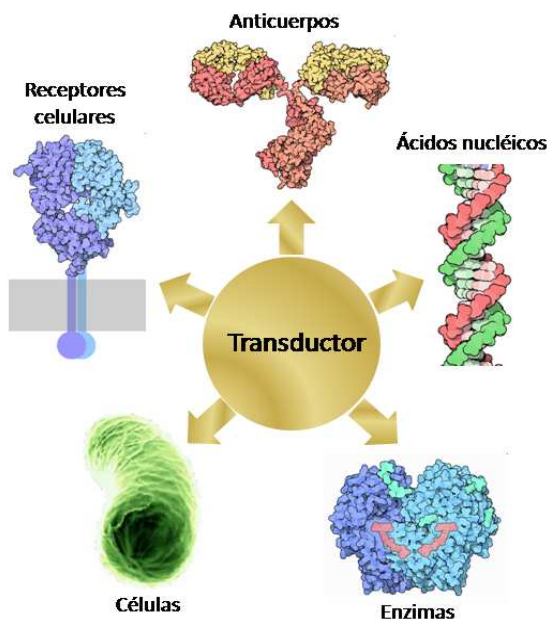


Fig. 1.8. Elementos de reconocimiento biológico más utilizados en el desarrollo de biosensores.

Biosensores catalíticos

Constituyen el tipo de biosensores más desarrollado. Estos sistemas utilizan biocatalizadores, elementos que favorecen una reacción química en la cual, a partir de un sustrato, se forma un producto sin que se consuma el biocatalizador, que puede ser utilizado de nuevo. Mediante estos dispositivos puede detectarse tanto sustratos que participan en la reacción como cualquier sustancia que inhiba de forma selectiva el funcionamiento del biocatalizador.

Las enzimas han sido los elementos de reconocimiento biológico más extensamente utilizados en la fabricación de biosensores debido a características como su elevada selectividad, una respuesta rápida, la gran variedad de enzimas disponibles, su capacidad de auto-regeneración, su bajo coste y la simplicidad de la construcción de los dispositivos. La viabilidad de la utilización de una enzima para formar parte de un biosensor viene determinada por la necesidad de una elevada actividad y estabilidad, fácil aislamiento e inmovilización. Desafortunadamente, muchas enzimas no son

suficientemente estables, su purificación es difícil o su inmovilización no es posible. Por ello, se ha intentado utilizar otro tipo de componentes biológicos como orgánulos celulares, células completas o tejidos.

La asimilación de diversas sustancias por parte de algunas células produce un cambio en la actividad respiratoria y la producción de metabolitos que pueden ser detectados por un transductor. En la práctica, existen algunas limitaciones para su desarrollo, entre las que destacan la falta de especificidad y los elevados tiempos de respuesta. En menor medida, se han empleado algunos orgánulos celulares e incluso tejidos completos como elementos de reconocimiento para la fabricación de biosensores.

Biosensores de afinidad

Los biosensores de afinidad se basan en la interacción del analito con el elemento de reconocimiento que produce una reacción de equilibrio en la que se establece un complejo analito-receptor. La detección de esta interacción puede llevarse a cabo utilizando algún tipo de marcador, o de forma directa, midiendo alguna propiedad física que se vea alterada por la formación del complejo. La principal limitación de este tipo de dispositivos es que, al tener que estar en contacto directo con la muestra, pueden verse afectados por la presencia de otras sustancias en algunas matrices complejas.

Se puede distinguir diferentes tipos de biosensores de afinidad: los inmunosensores, que utilizan anticuerpos, los biosensores de ácidos nucleicos, los biosensores basados en interacciones entre un ligando y un receptor. Aunque no son estrictamente elementos de reconocimiento biológicos, incluiremos en este apartado algunos elementos de reconocimiento biomiméticos como los aptámeros y los polímeros de huella molecular.

Los biosensores que utilizan anticuerpos como elemento de reconocimiento biológico son conocidos como inmunosensores [18, 28], ya que se basan en reacciones inmunológicas entre un anticuerpo y un antígeno. Los avances en biotecnología permiten disponer de anticuerpos para casi cualquier analito, lo que ha contribuido al amplio desarrollo de los inmunosensores, haciendo que sean los más utilizados dentro

de los biosensores de afinidad. La generación de anticuerpos recombinantes permite mejorar la estabilidad, afinidad y especificidad de estas biomoléculas, obtener variaciones, como fragmentos de anticuerpos, anticuerpos quiméricos así como la formación de proteínas de fusión que incorporen funciones que faciliten su purificación, la inmovilización y la orientación para su uso en biosensores [38].

Los receptores presentes en las membranas celulares han sido utilizados también como elementos de reconocimiento biológico. El desarrollo de biosensores basados en receptores ha sido menor que el de los inmunosensores debido a algunas desventajas prácticas de su utilización. El aislamiento de estos receptores es complicado y, a diferencia de los anticuerpos, requiere protocolos individuales para cada caso. Por otro lado, los receptores necesitan encontrarse en su medio natural para su correcto funcionamiento. Además, su diversidad molecular hace que se necesiten métodos específicos tanto para su marcaje como para su inmovilización. Puede utilizarse también células que presenten ciertos receptores de forma natural, e incluso organismos bioluminiscentes, aunque los progresos en ingeniería genética hacen posible la modificación de las células para que respondan a diferentes estímulos.

Los biosensores basados en ácidos nucleicos utilizan otro tipo de mecanismo de reconocimiento biológico que implica el proceso conocido como hibridación de cadenas complementarias de ácidos nucleicos. La complementariedad de las bases adenina (A) : timina (T) y citosina (C) : guanina (G), en el caso del ácido desoxiribonucleico (ADN), es la base de la especificidad de este tipo de reconocimiento. Estos bioreceptores han recibido un creciente impulso en los últimos años para el desarrollo de biosensores. Sus ventajas se basan tanto en su excepcional estabilidad como en la especificidad de la interacción. La capacidad actual para sintetizar este tipo de cadenas hace posible que conocida cierta secuencia de la cadena de ácidos nucleicos, se pueda construir la secuencia complementaria. Esta molécula complementaria, también conocida como sonda, puede sintetizarse con algún tipo de marcador e incluso con grupos funcionales que faciliten su inmovilización.

Los polímeros de huella molecular (MIPs) [39] no son estrictamente elementos de reconocimiento biológicos ya que son receptores sintéticos biomiméticos fabricados mediante la técnica de impresión molecular. Los MIPs reproducen de una forma muy

básica el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos y presentan características ventajosas para el desarrollo de biosensores, como su elevada sensibilidad y selectividad y la posibilidad de producir receptores para la detección de muy diversos analitos con un coste bajo para la producción a gran escala, todo ello unido a su elevado tiempo de vida, ya que presentan una elevada resistencia química, térmica y mecánica que permite su utilización en entornos agresivos que degradarían otros receptores. Por otro lado, esta es una tecnología actualmente en desarrollo y tiene algunos inconvenientes por resolver, como el perfeccionamiento del proceso de fabricación y la obtención de mejores afinidades.

Los aptámeros [40] también son moléculas biomiméticas que consisten en secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas para unirse a diferentes analitos. Son aislados a partir de grandes librerías combinatorias de oligonucleótidos mediante una técnica de selección *in vitro* y amplificación conocida como evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial, SELEX (del inglés *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*). Presentan algunas ventajas como su estabilidad, su flexibilidad para modificar las constantes de asociación y disociación, la posibilidad de introducir grupos funcionales en su estructura sin afectar a la interacción, evitan la necesidad de generar respuesta inmune y de utilizar animales y presentan una elevada capacidad de producción a gran escala, minimizando la variación entre lotes y con un coste bajo. Su principal inconveniente, al igual que en el caso de los polímeros de huella molecular, son sus reducidas constantes de afinidad, que tendrán que mejorar para poder demostrar su gran potencial.

1.4.2. Transductores

Los biosensores también pueden clasificarse en función al método de transducción empleado. La naturaleza de la interacción producida entre el elemento de reconocimiento biológico y el analito determina cual es el mecanismo de transducción más adecuado. La gran variedad de mecanismos de transducción existentes puede dividirse en estas grandes categorías:

- Electroquímicos
- Ópticos

- Piezoeléctricos
- Nanomecánicos

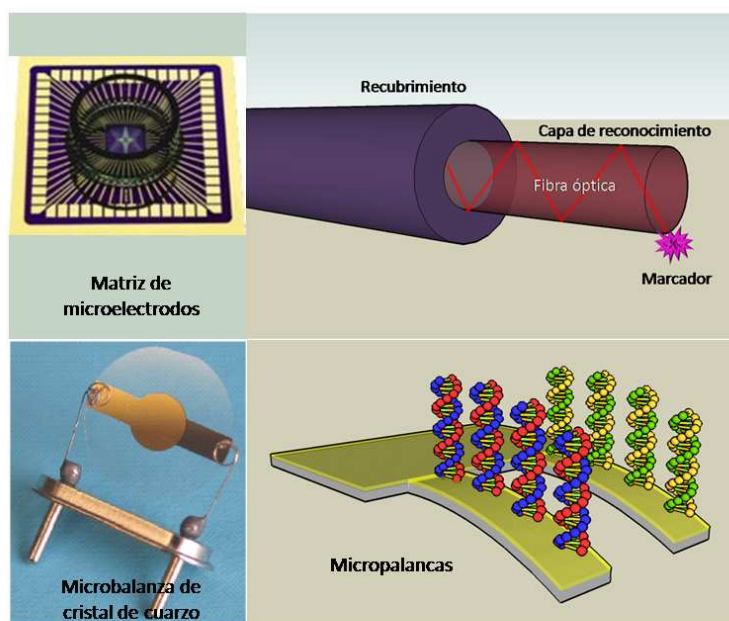


Fig. 1.9. Dispositivos representativos de cada una de las clases de biosensores en cuanto al tipo de transductor.

Los biosensores que utilizan transductores electroquímicos han dominado claramente tanto la investigación como la comercialización en este campo en los últimos años, aunque últimamente los biosensores ópticos están imponiéndose debido a su mayor sensibilidad. Los transductores electroquímicos miden el cambio que se produce en un electrodo químicamente modificado como consecuencia de la interacción entre el elemento de reconocimiento biológico y el analito. Suelen utilizarse junto con elementos de reconocimiento catalíticos, debido a que las reacciones correspondientes generan sustancias electroactivas, cambios en el pH, en el potencial, etc. Se suelen dividir en cuatro sub-clases que comprenden los transductores amperométricos, potenciométricos, conductimétricos e impedimétricos en función de que los cambios detectados sean en la corriente, el potencial, la conductividad o la impedancia, respectivamente [41]. El hecho de que hayan sido los dispositivos más desarrollados hasta el momento se debe a que son simples de fabricar y usar, fiables y además

proporcionan una rápida respuesta. Aunque existe un reducido número de aplicaciones que funcionan de modo directo, en general suelen necesitar marcadores electroactivos.

Los sistemas de transducción piezoeléctricos [42] miden cambios de masa producidos por la unión del elemento de reconocimiento biológico y el analito. Los materiales piezoeléctricos consisten en cristales que pueden hacerse oscilar con una frecuencia específica al aplicarles una corriente eléctrica adecuada. La frecuencia de la oscilación depende de la masa del cristal, por lo que cuando está cubierto por un elemento de reconocimiento biológico y se produce la interacción con el analito, la variación de masa producida da lugar a una variación en la frecuencia de oscilación. Este tipo de dispositivos suelen ir asociados a receptores de afinidad, y más concretamente a anticuerpos. Las principales ventajas que presentan estos transductores son la posibilidad de llevar a cabo una detección directa, sin necesidad de marcadores y en tiempo real de la interacción correspondiente y su bajo coste. En cuanto a sus inconvenientes, podemos destacar las dificultades para depositar el elemento de reconocimiento sobre el cristal y la sensibilidad a interferencias cuando se trabaja en medio líquido, así como los problemas producidos por la unión inespecífica de algunos componentes presentes en matrices complejas.

Los transductores nanomecánicos consisten en micropalanca que deflexan debido a la tensión superficial producida cuando tiene lugar el reconocimiento biomolecular [43, 44]. Constituyen una de las clases más novedosas dentro del campo de los biosensores y son capaces de proporcionar una elevada sensibilidad en medidas localizadas, de alta resolución y sin necesidad de utilizar ningún tipo de marcador. Las micropalanca convierten la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento biológico en un movimiento nanomecánico que generalmente va acoplado a una lectura óptica o piezoresistiva. La detección de la respuesta puede llevarse a cabo mediante el modo estático, en el cual se mide la deflexión de la micropalanca, o mediante el modo dinámico, en el cual se mide la variación en la frecuencia de resonancia de la micropalanca. La fabricación de este tipo de dispositivos se lleva a cabo mediante tecnología microelectrónica, por lo que puede fabricarse matrices de decenas o cientos de micropalanca que podrían permitir la medida en

paralelo, de forma rápida y en tiempo real de multitud de analitos sin necesidad de utilizar marcadores [45].

Transductores ópticos

Los biosensores ópticos se pueden definir como dispositivos que hacen uso de principios ópticos para la transducción de una reacción de reconocimiento biológico en una señal de salida adecuada. La interacción biomolecular en la superficie del sensor modula las características de la luz en el transductor, como la intensidad, fase o polarización, por lo que la interacción puede ser detectada por el cambio en diversas propiedades como la absorción, fluorescencia, luminiscencia o el índice de refracción, entre otras [46]. El grupo de los transductores ópticos es el más amplio en cuanto a la variedad de técnicas utilizadas y ha experimentado un amplio desarrollo en la última década, con el consiguiente impacto en las tecnologías analíticas para la detección de especies químicas y biológicas. Este tipo de tecnología fotónica puede convertirse en una alternativa o un complemento a las técnicas analíticas convencionales, evitando el uso de procedimientos de análisis caros, complejos y lentos.

Los dispositivos ópticos muestran diversas ventajas sobre los transductores electroquímicos ya que no presentan interferencias electromagnéticas, no necesitan electrodos de referencia, en general tienen una mayor sensibilidad, permiten trabajar usando diferentes longitudes de onda y pueden operar en ambientes agresivos. En el caso de utilizar fibras ópticas, los dispositivos son baratos, pequeños, ligeros, flexibles y permiten llevar a cabo medidas remotas. Además, los transductores ópticos tienen un gran potencial para la detección de múltiples sustancias en paralelo.

Los transductores ópticos se basan en guías de onda. Aunque hasta ahora las fibras ópticas han sido mayoritariamente empleadas para éste propósito debido a su bajo coste, pequeño tamaño y flexibilidad, el uso de guías de onda ópticas, planas o acanaladas, construidas mediante tecnología optoelectrónica, ha experimentado un incremento exponencial por lo que están superando el empleo de las fibras ópticas, debido a que pueden ser diseñadas para tener mayor sensibilidad en la medida.

En los transductores ópticos directos [46, 47], la luz entra en el dispositivo, se dirige a la superficie sensora y es reflejada. La luz de salida contiene información de las

interacciones que estén ocurriendo en esa superficie. Los transductores ópticos directos más utilizados son los que detectan cambios producidos en el índice de refracción, entre los que se puede incluir los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR), los sistemas de óptica integrada como los interferómetros junto con algunos más novedosos como los anillos ópticos resonadores y los cristales fotónicos.

Aunque la detección directa no es tan sensible como puede llegar a ser la indirecta, presenta algunas ventajas, ya que ahorra los pasos requeridos para la preparación de la muestra y el marcaje y puede ser llevada a cabo en tiempo real, permitiendo tanto la determinación de la concentración de la molécula como las constantes cinéticas de la interacción. Por otro lado, presenta algunas desventajas como los problemas derivados de la adsorción inespecífica de los componentes de algunas matrices complejas y la baja sensibilidad para medir analitos de bajo peso molecular en pequeñas concentraciones, ya que no producen cambios detectables en el índice de refracción, por lo que no pueden ser detectados de forma directa.

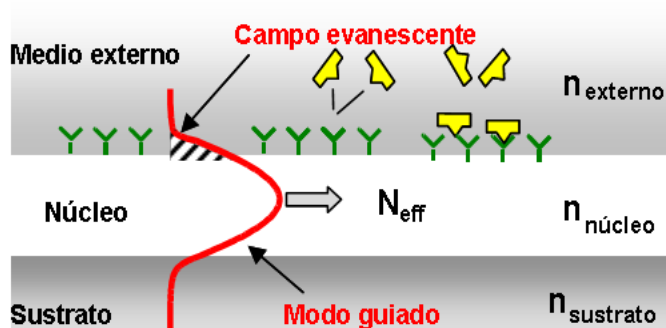


Fig. 1.10. Esquema básico del funcionamiento de un biosensor de onda evanescente

El principio más ampliamente usado en los biosensores ópticos para la detección de variaciones en el índice de refracción es mediante ondas evanescentes. Una guía de ondas consiste en una capa de alto índice de refracción situada entre dos capas de materiales de un índice de refracción menor. La transmisión de la luz a lo largo de las guías de ondas se produce mediante múltiples reflexiones internas en condiciones de reflexión interna total (TIR). En cada una de estas reflexiones, una componente de la luz, denominada onda evanescente, se propaga en el medio que

envuelve la guía. De esta manera, las propiedades ópticas del transductor son modificadas por los cambios en los parámetros ópticos del medio en contacto con la superficie del sensor debido a la interacción con la luz evanescente que penetra en el medio adyacente. Esta onda, penetra en este medio entre 50 – 500 nm, dependiendo de la longitud de onda empleada y los materiales que constituyen la guía de ondas, y decae exponencialmente desde la superficie, por lo que la zona de detección más sensible se encuentra en la superficie del transductor. (Fig 1.10).

Si inmovilizamos una capa de receptor biológico sobre la guía de ondas, como muestra la Fig. 1.10, al poner la superficie en contacto con las moléculas de analito, se produce una interacción biológica que induce un cambio en las propiedades ópticas y que es detectado por medio de la onda evanescente. Debido a que la onda evanescente decae exponencialmente al penetrar en el medio externo, detecta preferentemente los cambios que tienen lugar en la superficie de la guía de ondas, donde la intensidad de la onda evanescente es mayor. De esta manera, no es necesario llevar a cabo una separación previa del resto de componentes de la muestra, ya que los cambios producidos en el resto del volumen no afectan a la respuesta del sensor. Los sensores de onda evanescente son dispositivos muy selectivos y sensibles para la detección de especies biológicas y químicas y para la medida de interacciones moleculares *in situ* y en tiempo real. Estos sistemas constituyen los biosensores más sensibles sin necesidad de marcadores, como puede observarse en la Tabla 1.4.

Debido a la amplitud de las técnicas aplicadas a los biosensores ópticos es difícil realizar una clasificación sencilla. En este trabajo adoptamos una clasificación en tres tipos principales: biosensores de fibra óptica, biosensores de resonancia de plasmón superficial y biosensores de óptica integrada.

Biosensores de fibra óptica

Los biosensores de fibra óptica [29] se basan en la transmisión de la luz por una fibra hasta el lugar de análisis. Estos dispositivos se pueden clasificar en extrínsecos e intrínsecos. En los extrínsecos, la luz viaja a través de la fibra hasta el extremo, donde se encuentra inmovilizada una capa sensora. La luz reflejada, dispersada o emitida regresa desde la muestra y puede ser interpretada en el detector para determinar la

concentración del analito. El esquema de detección más sencillo puede usar la absorbancia en el caso de que el analito absorba una longitud de onda determinada, aunque también se pueden llevar a cabo medidas de fluorescencia utilizando marcadores adecuados. En los intrínsecos, se usa generalmente una fibra óptica en la que se retira el recubrimiento en una zona, dejando descubierto el núcleo, donde se inmovilizan los receptores biológicos. Se pueden detectar cambios a través de la interacción con el campo evanescente en la absorbancia, luminiscencia, polarización o índice de refracción, aunque normalmente no permiten llevar a cabo medidas directas, por lo que se suelen emplear marcadores fluorescentes.

Tabla 1.4. Tabla comparativa de la sensibilidad de diferentes sensores sin marcadores sensibles a la masa [46]

Biosensores	Sensibilidad (pg/mm ²)	Sensibilidad Δn
Biosensores ópticos directos		
Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)	0.5-1	10^{-5} - 10^{-6}
Interferómetro de Mach-Zehnder (MZI)	0.06	10^{-7} - 10^{-8}
Interferómetro de Young	0.7	10^{-7}
Espejo resonante	0.1	10^{-6}
Red de difracción	1	10^{-6}
Biosensores piezoeléctricos		
Microbalanza de cristal de cuarzo (QCM)	10	-
Biosensores nanomecánicos		
Micropalancas resonantes	10^4	-
Resonador acústico MEMS	100	-
Resonador suspendido de microcanal	0.1	-

La sensibilidad de este tipo de dispositivos puede alcanzar límites de detección en el orden fM. El desarrollo de esta tecnología para telecomunicaciones ha proporcionado fibras y componentes de gran calidad. Los biosensores de fibra óptica son fácilmente miniaturizables e integrables, pudiéndose desarrollar dispositivos

portátiles con múltiples canales de medida, lo que ha hecho posible un amplio desarrollo comercial que ha permitido incorporarlos a procesos industriales y alimentarios, control medioambiental y aplicaciones clínicas. Debido a que las fibras ópticas están fabricadas con vidrio, son muy robustas, toleran altas temperaturas, vibraciones, golpes y otras duras condiciones, además de ser relativamente seguras y biocompatibles para su uso dentro del cuerpo humano.

Biosensores basados en resonancia de plasmón superficial (SPR)

Estos dispositivos se describen en mayor detalle en el punto 1.5. Brevemente, los biosensores de resonancia de plasmón superficial detectan las interacciones entre un elemento de reconocimiento biológico inmovilizado en una superficie de oro y el analito, que se encuentra en una disolución. Cuando un rayo de luz polarizada incide sobre la interfase entre estos dos medios en un ángulo concreto, se produce el fenómeno de resonancia de plasmón superficial. Al registrar de forma continua la luz reflejada, se obtiene un perfil de los cambios del índice de refracción en el medio adyacente a la superficie metálica, que proporciona información en tiempo real de las interacciones que ocurren en él. Los biosensores SPR han sido ampliamente desarrollados y comercializados, y actualmente pueden encontrarse numerosos sistemas comerciales en el mercado.

Biosensores de óptica integrada

Las ventajas de los sensores ópticos aumentan significativamente cuando se utilizan dentro de un esquema integrado. La tecnología de óptica integrada está basada en el uso de guías de ondas planas o acanaladas que permiten incluir en el mismo sustrato otros componentes ópticos como rejillas, divisores, combinadores y otros dispositivos relacionados. Este diseño permite un desarrollo flexible de dispositivos sensores miniaturizados y compactos con la posibilidad adicional de fabricar múltiples sensores en un solo chip. Otras ventajas son la miniaturización, robustez, fiabilidad, potencial reducción de costes por producción en masa, bajo consumo energético y simplicidad del alineamiento de los elementos ópticos. Existen diversos tipos de

biosensores ópticos integrados entre los que destacan los interferómetros, redes de difracción y espejos resonantes, que se tratarán a continuación.

Los dispositivos interferométricos proporcionan una elevada sensibilidad, un amplio rango dinámico y son los únicos que suministran una referencia interna que compensa las fluctuaciones en el índice de refracción debido a los cambios en temperatura y a la adsorción inespecífica. Existen varios dispositivos interferométricos que han sido utilizados como sistemas de transducción en biosensores entre los que destacan el interferómetro de Mach-Zehnder y el interferómetro de Young.

El interferómetro de Mach-Zehnder (MZI) [48] es el más comúnmente empleado para la fabricación de dispositivos biosensores interferométricos. En este dispositivo, la luz de un láser entra en una guía de onda monomodal que se divide en dos ramas iguales, una de las cuales presenta una zona sensora y la otra sirve como referencia, para posteriormente recombinarse, produciendo una señal dependiente de la diferencia de fase entre las dos ramas (Fig. 1.11). Cualquier cambio químico o bioquímico producido en la región de campo evanescente de la zona sensora genera un cambio en su índice de refracción efectivo. A la salida del dispositivo, la intensidad de la luz que procede de ambas ramas interfiere, produciéndose una variación sinusoidal que depende de la diferencia entre los índices de refracción efectivos de cada rama y de la longitud de la zona sensora.

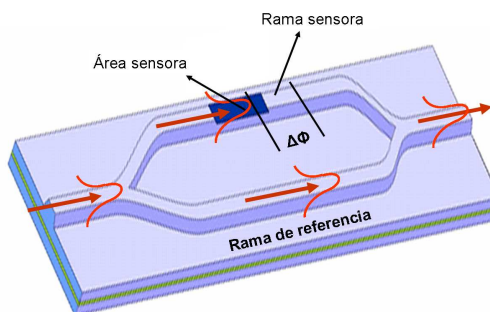


Fig. 1.11. Esquema del funcionamiento del interferómetro de Mach-Zehnder

La posibilidad de usar zonas sensoras de gran longitud permite aumentar la sensibilidad de los dispositivos, pudiéndose alcanzar resoluciones en el índice de refracción de 10^{-7} . Estas características convierten al MZI en el biosensor óptico de

medida directa más sensible, con límites de detección teóricos menores de pM para moléculas pequeñas y sin hacer uso de marcadores [49]. La principal desventaja para el desarrollo y comercialización del dispositivo MZI integrado es la complejidad del diseño, la fabricación y los ajustes ópticos aunque, recientemente, con la utilización de la micro- y nanotecnología para su integración en silicio, pueden construirse dispositivos más estables, sensibles y miniaturizados, haciendo posible además su producción en masa. La integración de este tipo de sistemas permite fabricar el interferómetro en una oblea sobre la que se puede incluso incorporar el sistema de microfluídica necesario para hacer llegar las muestras a la zona sensora [50].

El interferómetro de Young es otro dispositivo interferométrico muy interesante formado por una bifurcación de óptica integrada que actúa como divisor de haz, como se puede observar en la Fig 1.12. Es muy similar al MZI, pero en este caso, las dos ramas no vuelven a recombinarse dentro del dispositivo, sino que la luz que sale de ellas se hace interferir externamente a la salida, produciéndose un patrón de interferencia cuya distribución de intensidades se registra mediante un detector, por ejemplo una cámara CCD. Cuando se produce una interacción biomolecular en la superficie de la rama sensora, se origina un desplazamiento lateral de estas franjas. La principal desventaja de este dispositivo es la distancia desde la salida hasta el detector que es necesaria para obtener una máxima resolución. Entre sus ventajas se incluyen la simplicidad del montaje, la detección de la distribución completa de intensidades y la idéntica longitud de las dos ramas, que permite evitar los efectos producidos por los cambios de temperatura y la deriva de la longitud de onda. El límite de detección teórico es alrededor de 10^{-7} en el índice de refracción y se ha medido un límite de detección experimental de 50 ng/mL para la detección de proteínas.

En los dispositivos de espejo resonante un haz de luz polarizada se acopla mediante un prisma a través de una capa espaciadora de sílice de bajo índice de refracción en una guía de ondas de alto índice de refracción, formada por titanio, hafnio o nitruro de silicio, y sufre múltiples reflexiones internas. Estas reflexiones producen un campo evanescente que penetra en la zona de medida, por lo que pueden detectarse cambios producidos en la superficie, alcanzando sensibilidades del orden de 10^{-6} en el índice de refracción. Este dispositivo permite obtener información en tiempo real sobre

interacciones biomoleculares si se inmoviliza una capa de biorreconocimiento adecuada sobre su superficie (Fig. 1.13). Este tipo de sistemas pueden ser fabricados en grandes cantidades con costes y tolerancias razonables y es actualmente comercializado bajo el nombre IAsys por Farfield (Reino Unido).

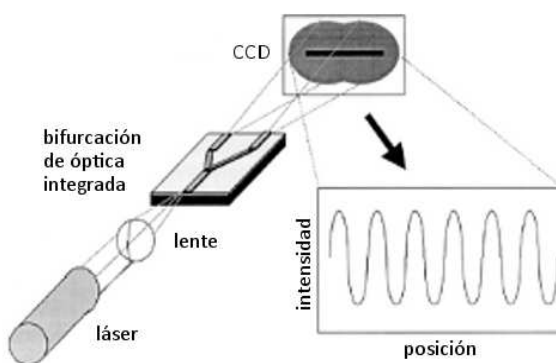


Fig. 1.12. Esquema del funcionamiento del interferómetro de Young

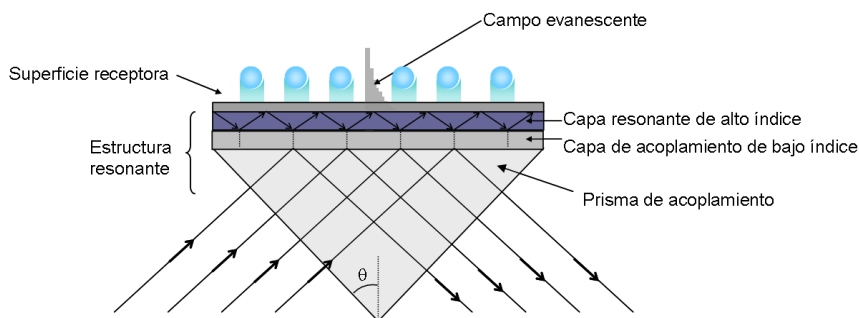


Fig. 1.13. Esquema del funcionamiento del espejo resonante

Los biosensores de acoplamiento por red de difracción consisten en una red de difracción fabricada en una guía de ondas con un núcleo de alto índice de refracción, generalmente SiO_2 dopado con TiO_2 , sobre un sustrato de bajo índice de refracción, generalmente de vidrio. La red de difracción permite acoplar la luz de un láser en la guía de ondas o desacoplar la luz en la salida del dispositivo. El ángulo al que se produce el acoplamiento o el desacoplamiento es muy sensible a cualquier variación en

el índice de refracción en la superficie de la red de difracción, dentro del campo evanescente producido en la interfase. Esta configuración (Fig.1.14) permite obtener un valor alto en la longitud de penetración del campo evanescente, lo que proporciona un dispositivo muy sensible, con un límite de detección de 10^{-6} en el índice de refracción. Este sistema está comercializado por Artificial Sensing Instruments (Suiza).

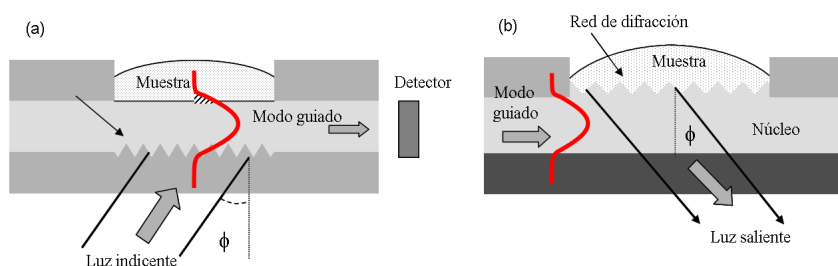


Fig. 1.14. Esquema del biosensor de acoplamiento por red de difracción utilizando el ángulo de acoplamiento (a) y desacoplamiento (b)

1.5. Biosensores de resonancia de plasmón superficial

Los biosensores de resonancia de plasmón superficial (SPR) pertenecen a la categoría de los dispositivos ópticos refractométricos, que miden los cambios de índice de refracción producidos en el campo de una onda electromagnética contenida en la estructura del sensor. La introducción de este fenómeno fue llevada a cabo por Otto [51] y Kretschmann y Raether en 1968 [52] y las primeras demostraciones de su uso para el estudio de procesos superficiales en metales [53] y para la detección de gases [54] así como la primera aplicación para la detección de interacciones biomoleculares por parte de Liedberg, Nylander y Lundström [55] se llevaron a cabo entre los años 1980-1983.

Los plasmones superficiales son oscilaciones colectivas de los electrones del metal que pueden excitarse al hacerse incidir un rayo de luz polarizada en un ángulo de incidencia concreto denominado ángulo de resonancia en la interfase de dos medios con constantes dieléctricas opuestas como en el caso de un metal y un dieléctrico [56]. La resonancia de plasmón superficial es un modo transversal magnético (TM) que se

propaga en el plano de la interfase y es perpendicular a la dirección de propagación. La intensidad del campo magnético alcanza el máximo en la interfase y decae al penetrar en el metal y en el dieléctrico de forma logarítmica. La condición de resonancia que ha de cumplirse para que se produzca la excitación del plasmon superficial hace que se igualen los vectores de propagación del plasmón de superficie (κ_{sp}) y el componente paralelo a la superficie de las ondas electromagnéticas incidentes ($\kappa_{x,d}$):

$$k_{xd} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin \theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

donde ω es la frecuencia angular, c es la velocidad de la luz en el vacío, θ es el ángulo de incidencia, λ es la longitud de onda, ϵ_m es la permitividad del metal y ϵ_d es la permitividad del dieléctrico. De esta ecuación puede deducirse que para que se produzca la propagación de la resonancia de plasmón superficial las permitividades ϵ_m y ϵ_d han de tener signos opuestos y $\epsilon_m < -\epsilon_d$. Esta condición sólo se cumple al utilizar metales como el oro, la plata y el aluminio y frecuencias en la zona entre el visible y el infrarrojo. El grosor de la capa de metal es crítico para el valor del mínimo de reflectancia y depende de las constantes ópticas del medio y de la longitud de onda de la luz incidente [56]. Para el oro, el grosor óptimo es 45 nm a una longitud de onda de 790 nm.

El acoplamiento de la luz para excitar el plasmón superficial en la interfase del metal y el dieléctrico se puede llevar a cabo mediante varios dispositivos de acoplamiento entre los que se incluyen prismas, guías de ondas y redes de difracción. La utilización de prismas de acoplamiento, conocida como configuración de Kretschmann [52, 56], constituye el método más utilizado para la excitación del plasmón superficial. En esta configuración del método de reflectancia total atenuada (ATR), un rayo de luz atraviesa un prisma de alto índice de refracción y es reflejado, generando una onda evanescente que penetra en la capa metálica. Esta onda se propaga a lo largo de la interfase con una constante de propagación que, en las condiciones descritas anteriormente, produce la excitación del plasmon superficial (Fig 1.15).

El plasmon superficial puede ser excitado también mediante la luz guiada por una guía de ondas óptica. Una porción de la luz que se propaga en una guía de ondas

penetra como una onda evanescente en el medio que la rodea. Cuando la luz penetra en la región de la guía de ondas que presenta una capa metálica, esta onda evanescente excita el plasmon superficial. Por último, el tercer método para conseguir la excitación óptica de los plasmones superficiales se basa en la utilización de una red de difracción. La luz difractada puede acoplarse al plasmón superficial si sus constantes de propagación se igualan [57].

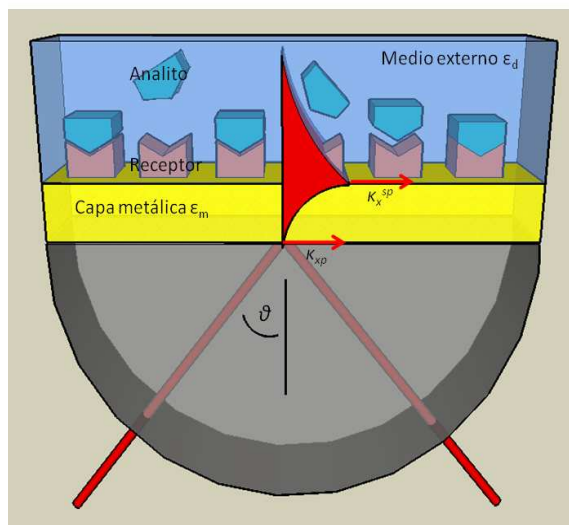


Fig. 1.15. Esquema de un sensor SPR en la configuración de Kretschmann
 $(K_{xp}$ = componente x del vector de onda de la luz incidente, K_x^{sp} = componente x del vector de propagación del plasmón de superficie, θ = ángulo de incidencia, ϵ = constante dieléctrica).

Los sensores SPR miden cambios en el índice de refracción en la superficie de un metal que presenta plasmón superficial y pueden ser dispositivos biosensores altamente sensibles para detectar interacciones biomoleculares cuando un elemento de reconocimiento adecuado se inmoviliza en la proximidad de la superficie de la capa metálica. Las moléculas de analito que entran en contacto con el biosensor, se unen al elemento de reconocimiento, produciéndose un incremento del índice de refracción local en la superficie. Los cambios en el índice de refracción de este medio producen cambios en la constante de propagación del plasmón superficial, que a su vez altera características de la luz acoplada a éste como el ángulo y la longitud de onda de acoplamiento, la intensidad o la fase. Al registrar de forma continua la luz reflejada, se

obtiene un perfil de los cambios del índice de refracción en el medio adyacente a la superficie metálica, obteniendo información en tiempo real de las interacciones que ocurren en él. En función de cuáles de estas características de la luz sean moduladas por el plasmón de superficie, los sensores SPR pueden clasificarse como sensores de modulación angular, de longitud de onda, de intensidad o de fase.

La gran mayoría de los biosensores SPR desarrollados hasta el momento usan el acoplamiento por prisma, ya que es un sistema práctico y simple que utiliza componentes ópticos convencionales y puede combinarse con diferentes modos de detección. La resolución en el índice de refracción de los sensores SPR con acoplamiento por prisma está generalmente entre $2 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-5}$ RIU (unidades de índice de refracción), aunque algunos dispositivos llegan a resoluciones de 10^{-7} RIU. Esto significa que el límite de detección actual de los dispositivos SPR está por debajo de 1 pg/mm^2 de material analizado.

En este trabajo se utiliza el método de medida consistente en registrar la intensidad de la luz reflejada mientras se mantiene un ángulo de incidencia fijo. En la Fig. 16a se representa la intensidad de la luz reflejada respecto del ángulo de incidencia. Se selecciona un ángulo cercano al mínimo de intensidad de la luz reflejada, en la zona de mayor pendiente de la curva, que proporciona una mayor sensibilidad. Cuando se produce un cambio en el índice de refracción, puede detectarse en tiempo real por medio de la variación de la intensidad de la luz reflejada (Fig. 16b).

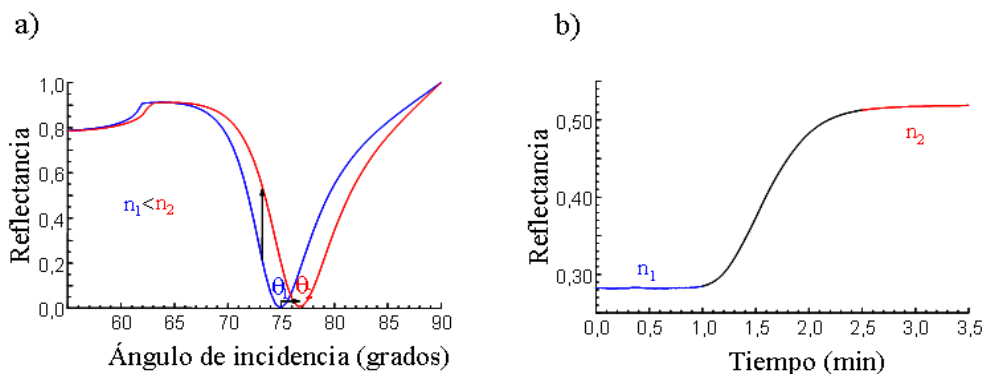


Figura 1.16. a) Respuesta del sensor SPR al cambio de índice de refracción midiendo la intensidad de luz reflejada en función del ángulo de incidencia y b) en función del tiempo a un ángulo de incidencia fijo.

Tabla 1.5. Biosensores SPR presentes en el mercado en el año 2008

Compañía	Instrumento	País
Biacore	Biacore A100 Biacore T100 Biacore X100 Biacore Flexchip Biacore C Biacore Q Biacore J Biacore 3000 Biacore X	Suecia
Sensata Technologies	Spreeta	Estados Unidos
ICx Nomadics	SensiQ SensiQ Pioneer SensiQ Discovery	Estados Unidos
Optrel	Multiskop	Alemania
Reichert Analytical Instruments	SR-7000 DC SR-7000	Estados Unidos
Plasmonic Biosensor AG	Plasmonic	Alemania
Eco Chemie	Autolab Springle Autolab Esprit	Holanda
DKK-TOA Corp.	SPR-20	Japón
Analytical μ -Systems	Biosuplar 6	Alemania
Sensia	β -SPR	España
GWC Technologies	SPRimager II	Estados Unidos
IBIS Technologies	IBIS-iSPR	Holanda
GenOptics	SPRi-Plex SPRi-Lab+	Francia
Bio-Rad	ProteOn XPR36	Israel
Fujifilm	AP-3000	Estados Unidos
BiOptix	BiOptix 207B1	Estado Unidos

Los desarrollos llevados a cabo durante la década de los 80 dieron como fruto el lanzamiento del primer instrumento comercial BIAcore por parte de la compañía Pharmacia Biosensor en 1990. En las décadas siguientes, esta tecnología ha realizado grandes avances en el desarrollo de instrumentación y aplicaciones, convirtiéndose en una herramienta principal en la caracterización y cuantificación de interacciones biomoleculares. Además, el uso de biosensores SPR para la detección de diferentes especies biológicas y químicas ha experimentado también un gran crecimiento. El interés generado por este tipo de dispositivos ha hecho que el número de publicaciones y de compañías que los comercializan (Tabla 1.5) no haya cesado de crecer desde su

nacimiento. Se han publicado excelentes libros [58] y revisiones específicas sobre biosensores SPR tanto centrados en el estudio de interacciones biomoleculares [59-64] como en la detección de analitos químicos y biológicos [30].

Los biosensores SPR permiten llevar a cabo el seguimiento de interacciones entre moléculas en tiempo real, proporcionando información como:

- la especificidad de la interacción, que está relacionada con el grado de unión de diferentes parejas de moléculas.
- la cinética y la afinidad de la interacción, mediante el estudio de las curvas y niveles de unión en relación a modelos de interacción.
- la concentración de moléculas presentes en la muestra, que se relaciona con el nivel de respuesta.

Los biosensores SPR pueden detectar reacciones de reconocimiento en un intervalo muy amplio de pesos moleculares, velocidades de unión y de afinidad [65]:

- Peso molecular del analito: debido a que la respuesta SPR está relacionada con la masa de analito en la superficie, depende de su peso molecular. Aún teniendo en cuenta este factor, los biosensores SPR son capaces de detectar interacciones moleculares en las que participan analitos en un rango de tamaños muy amplio, desde moléculas de unos cientos de daltones a células completas, aunque la sensibilidad está limitada para los analitos de mayor tamaño que la distancia de penetración del campo evanescente.
- Afinidad: puede trabajarse en intervalos que comprenden niveles de afinidad de sub-picomolar hasta milimolar. Los niveles de afinidad muy elevados suelen presentar velocidades de disociación muy bajas, que impiden el estudio cinético y dificultan la reutilización del sensor. Las interacciones de muy baja afinidad quedan por debajo de los límites de sensibilidad del dispositivo.
- Velocidades: las velocidades de la interacción pueden extenderse en un amplio rango. Para llevar a cabo estudio cinéticos, la velocidad de asociación (k_{on}) debe estar entre 10^3 y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$ y la velocidad de disociación (k_{off}) entre 10^{-5} y 1 s^{-1} .

El análisis de interacciones moleculares con biosensores SPR puede llevarse a cabo en un extenso intervalo de condiciones químicas y ambientales. En función de la medida que se persiga, se pueden emplear diferentes temperaturas, fuerzas iónicas o pH. De esta manera, el análisis de la cinética y termodinámica de la unión puede proporcionar una comprensión única de los mecanismos de las reacciones.

Los biosensores SPR presentan características ventajosas entre las que se incluyen:

- versatilidad; pueden detectar cualquier analito para el que se disponga un elemento de reconocimiento biológico sin que sean necesarias propiedades especiales como bandas de absorción o fluorescencia, permitiendo analizar un amplio rango de especies que abarca desde pequeños péptidos a anticuerpos, virus y bacterias. Se han aplicado al estudio de interacciones biomoleculares entre las que se puede destacar interacciones antígeno-anticuerpo, ligando-receptor e hibridación de ADN
- ausencia de marcador, la interacción biomolecular puede observarse sin el uso de marcadores fluorescentes, lo que además del ahorro, tanto económico como de tiempo de trabajo, evita interferir en la interacción estudiada.
- velocidad de análisis; la unión puede observarse rápidamente, de forma continua y en tiempo real, lo que permite estudiar la cinética de la interacción y determinar sus mecanismos fundamentales.
- amplio rango dinámico, pudiendo medir concentraciones que se encuentran generalmente en el rango de 10^{-3} a 10^{-9} M, aunque puede llegarse incluso a 10^{-11} M.
- reducido volumen de muestra necesario para el análisis, del orden de los μL .
- reversibilidad, que contribuye a la reproducibilidad de las medidas y a la posible reutilización de la superficie sensora, siempre que la molécula receptora sea suficientemente estable.
- flexibilidad, como herramienta para análisis cuantitativo, determinación de afinidad de ligandos y estudios cinéticos, tanto como plataforma de investigación como para su uso rutinario o seguimiento continuo.

Las desventajas asociadas a este tipo de biosensor son:

- la inespecificidad de la detección, al estar basada únicamente en la capacidad del elemento de reconocimiento para capturar el analito, puede presentarse reactividad cruzada con otras especies presentes en la muestra, dependiendo de la calidad del receptor y de la preparación de la capa receptora formada en la superficie.
- sensibilidad a interferencias, principalmente debidas a la interacción inespecífica de especies presentes en la muestra con la superficie del sensor.
- como desventaja inherente al mecanismo físico del SPR, los analitos de peso molecular inferior a 5 kDa producen respuestas limitadas, aunque pueden ser detectados mediante formatos de ensayo de inhibición (Ver punto 1.6.4).

1.5.1. Elementos de reconocimiento biológico y su inmovilización

Los elementos de reconocimiento biológico más utilizados en biosensores SPR son los de afinidad, siendo los anticuerpos los que se han aplicado con más frecuencia. En los últimos años se han producido grandes avances mediante la utilización de fragmentos de anticuerpos, péptidos y aptámeros. El proceso de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico sobre la superficie del transductor es uno de los aspectos fundamentales en el desarrollo de un biosensor y ha de diseñarse de manera que permita la obtención de una densidad superficial óptima, evite a la vez la unión inespecífica de otras sustancias a la superficie y no afecte a la actividad biológica del elemento inmovilizado, manteniendo su estabilidad a lo largo del ensayo.

Los procedimientos principales para la inmovilización de moléculas en la superficie de los biosensores SPR están basados en la adsorción física, en uniones covalentes o en la captura mediante interacciones de alta afinidad. La adsorción física es el método más simple, ya que no requiere que la superficie sea modificada químicamente y sucede de forma directa a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Este tipo de inmovilización presenta desventajas como la posible desnaturalización de las biomoléculas al entrar en contacto con la superficie, la escasa estabilidad y reproducibilidad de la capa biológica formada y el escaso control sobre el proceso, que conduce a la formación de multicapas. Una de las aplicaciones principales para la que se hace uso de la unión por interacciones hidrofóbicas es la inmovilización

de proteínas de la membrana celular [66]. Este tipo de moléculas necesitan mantener un entorno hidrofóbico, por lo que son inmovilizadas en capas lipídicas formadas sobre la superficie de oro.

Las moléculas pueden ser inmovilizadas en la superficie de oro mediante la formación de una matriz de dos dimensiones, por medio de monocapas autoensambladas o mediante una matriz tridimensional, generalmente usando hidrogeles de dextrano carboximetilado. Las monocapas autoensambladas [67-69], conocidas como SAMs (del inglés self-assembled monolayers) proporcionan un método excelente para la inmovilización del elemento de reconocimiento biológico debido a la sencillez y fiabilidad del proceso, su reproducibilidad así como la flexibilidad que presentan para la incorporación de diferentes biomoléculas. Además el uso de SAMs permite llevar a cabo la inmovilización de estas moléculas con una densidad y orientación controlada. La formación de una SAM proporciona una monocapa uniforme y compacta que reduce la adsorción de moléculas inespecíficas y protege a las biomoléculas del contacto con la superficie, que podría desnaturalizarlas.

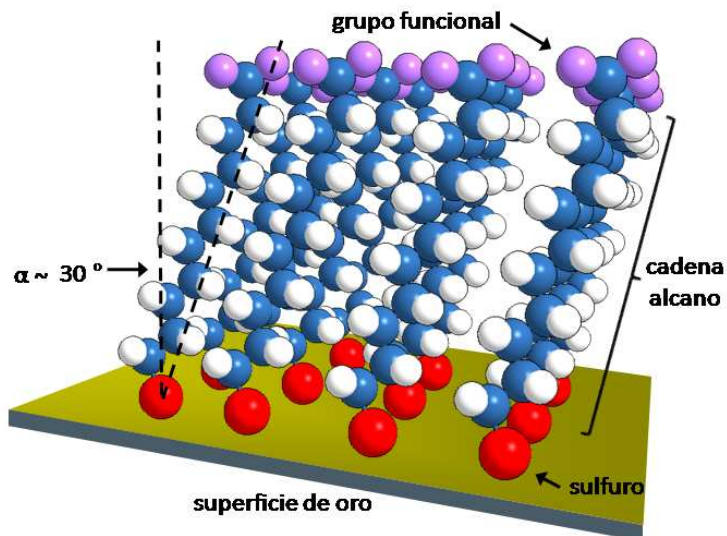


Figura 1.17. Representación esquemática de una SAM de alcanotioles sobre una superficie de oro.

En los biosensores SPR, la SAM se forma sobre la superficie de oro (Fig 1.17), generalmente mediante alcanotioles, aunque también puede usarse disulfuros. Este tipo de moléculas presentan gran afinidad por el oro y se unen a él por quimisorción. Una vez unidos, se produce un ordenamiento y empaquetamiento debido a las fuerzas de van der Waals entre sus cadenas alquílicas. El uso de alcanotioles de cadena larga, formados por cadenas de más de diez carbonos, produce SAMs más densas y ordenadas, de forma parecida a una estructura cristalina, mientras que los de cadenas más cortas producen estructuras menos ordenadas. La monocapa puede ser diseñada con grupos funcionales que permitan la unión del receptor biológico.

El uso de SAM mixtas [70, 71] compuestas por diferentes tioles permite el control del ordenamiento, densidad y orientación de las biomoléculas en la superficie. Puede utilizarse mezclas de tioles con diferentes longitudes de cadena, diferentes grupos funcionales que permitan varios tipos de inmovilización e incluso grupos que eviten la unión de moléculas inespecíficas [72].

El uso de hidrogeles de dextrano carboximetilado proporciona supuestamente un entorno tridimensional que presenta un mayor número de sitios de unión y un entorno flexible e hidrofílico más adecuado para la estabilidad de las biomoléculas [73, 74]. Estos geles son inmovilizados sobre la superficie de oro utilizando la química de las SAMs. Posteriormente, las biomoléculas pueden unirse a este hidrogel utilizando diferentes estrategias [73-75]. En la práctica, estas superficies presentan algunas desventajas asociadas a efectos estéricos relacionados con la falta de control sobre la distribución de los ligandos en la superficie [76]. Además, no producen una reducción conveniente de la unión inespecífica de biomoléculas presentes en la matriz de la muestra [77], y aunque presentan una estructura tridimensional con una gran cantidad de puntos disponibles para la inmovilización de biomoléculas, las densidades de inmovilización obtenidas son similares a las correspondientes a las monocapas autoensambladas bidimensionales [78].

La inmovilización covalente permite construir capas más estables, con una densidad controlada, evitando la formación de multicapas y consiguiendo así estructuras más reproducibles. La inmovilización covalente de proteínas generalmente se lleva a cabo por medio de la formación de un enlace entre los grupos electrófilos,

como carboxilos y aldehídos, en la superficie y los grupos nucleofílicos, como aminos o tioles, presentes en los aminoácidos de las proteínas. Este método no permite controlar la orientación de las biomoléculas que contienen varios grupos funcionales disponibles para la inmovilización. Además, en algunos casos, la modificación química produce una pérdida de afinidad de la molécula inmovilizada.

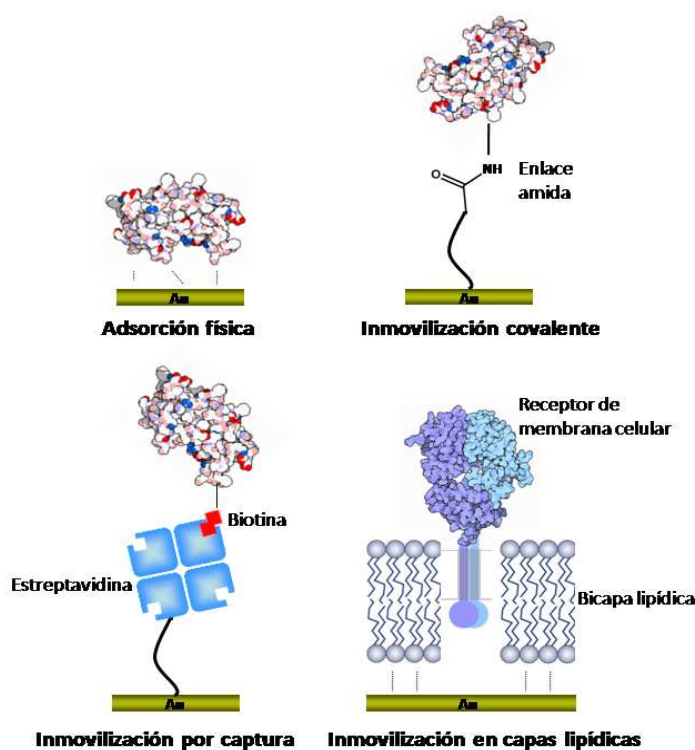


Figura 1.18. Representación esquemática de las principales categorías de técnicas de inmovilización del receptor biológico

¿Por último, se puede aprovechar ciertas interacciones de alta afinidad para capturar las biomoléculas. La molécula capturante normalmente está inmovilizada covalentemente a la superficie. Un ejemplo muy conocido es la interacción entre la proteína avidina (o la proteína similar llamada estreptavidina) y la vitamina biotina [79]. La unión entre los dos componentes de esta pareja se ha utilizado extensamente en diferentes aplicaciones biotecnológicas debido a su elevada afinidad [80], con una $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$, y a la facilidad con la que una gran variedad de moléculas pueden ser

modificadas con biotina sin modificar significativamente su actividad biológica. Esta unión es considerada irreversible, ya que sólo puede romperse mediante desnaturalización de la proteína. La avidina ha sido inmovilizada en diferentes superficies manteniendo su actividad biológica y se ha utilizado para la inmovilización de diferentes biomoléculas en biosensores [70, 71, 81, 82]. Mediante el control de la biotilación de la biomolécula puede conseguirse el control de su orientación.

En el caso de los anticuerpos, puede utilizarse la interacción entre su región Fc (Fig. 1.6) y las proteínas A y G. Las proteínas A y G son producidas por las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* y se unen a los fragmentos Fc de algunos anticuerpos, dejando libre los sitios de unión, localizados en los fragmentos Fab (Fig. 1.6), por lo que se ha utilizado inmovilizada en columnas de cromatografía de afinidad para la purificación de anticuerpos y, más recientemente, para la inmovilización en biosensores. Esta interacción no es tan fuerte como la producida entre estreptavidina y biotina, por lo que puede romperse en las condiciones utilizadas en el ensayo. Además, aunque puede conseguir la orientación del anticuerpo, se necesita un control de la propia orientación de la proteína A o G.

Otro método de inmovilización de afinidad está basado en la utilización de marcadores. El más utilizado es el que aprovecha la interacción entre proteínas con cadenas de histidina y quelatos como el ácido nitrilotriacético (NTA). Mediante ingeniería genética pueden producirse proteínas recombinantes que contengan cadenas de histidina en posiciones definidas. También se ha utilizado otros marcadores como la glutationa-S-transferasa (GST) y los epítomos Flag y c-myc. Esta técnica, inicialmente utilizada para simplificar la purificación de proteínas, permite la ordenación y orientación de la inmovilización de éstas. La principal ventaja de este tipo de marcadores es que proporciona a la vez una forma de purificación e identificación.

1.5.2. Prevención de interacciones inespecíficas

Un factor muy importante en la formación de la interfase entre el transductor y el elemento de reconocimiento biológico es la fabricación de superficies que eviten la unión inespecífica de proteínas. La adsorción de proteínas es un problema que no afecta exclusivamente a los biosensores, sino también a otras aplicaciones biológicas, por lo

que ha sido objeto de investigación exhaustiva. Este es uno de los retos principales con los que se encuentran los biosensores de afinidad, sobre todo cuando se quieren emplear para analizar muestras tan complejas como la sangre.

Se han realizado avances significativos en el desarrollo de recubrimientos superficiales que eviten la unión no específica de proteínas. En el caso de los biosensores, se han de generar superficies que eviten esta unión inespecífica y que a la vez proporcionen suficientes sitios de unión para la inmovilización de los elementos de reconocimiento biológico específicos. Se ha utilizado con éxito polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) y sus derivados [72, 83, 84] así como otros polímeros biocompatibles [77] en el desarrollo de recubrimientos superficiales resistentes a la adsorción no específica para biosensores SPR. Los alcanotioles terminados en grupos de oligoetilenglicol (OEG) se han aplicado en la formación de SAMs sobre las superficies de oro de los biosensores SPR [76, 85, 86]. Generalmente, se suelen formar SAMs mixtas de alcanotioles terminados en OEG que presenten diferentes grupos funcionales en la superficie, para que mientras que unos proporcionan un entorno resistente a la unión de proteínas, otros faciliten la inmovilización de biomoléculas, generalmente mediante la presencia de grupos carboxilo o biotina.

Otra estrategia para la reducción de las interacciones inespecíficas consiste en la optimización de la composición del tampón del ensayo [87, 88], ajustando principalmente su pH y fuerza iónica o mediante la incorporación de aditivos, entre los que destacan surfactantes como el Tween 20 o polisacaridos como el carboximetil dextrano (CM-Dextrano). La variación del pH, dentro de los límites adecuados para el funcionamiento del ensayo, hace que las proteínas de la muestra se encuentren cargadas en diferente medida, lo que permite que, debido a la naturaleza electrostática de la interacción inespecífica de las proteínas con la superficie, se pueda encontrar un pH en el que la atracción se minimice. El incremento de la fuerza iónica, produce un apantallamiento de las fuerzas electrostáticas entre las proteínas y la superficie que permite reducir la unión inespecífica. Hay que tener en cuenta que una fuerza iónica demasiado elevada puede afectar a la interacción específica, por lo que este parámetro se ha de mantener dentro de unos niveles moderados. El surfactante Tween 20 se utiliza de comúnmente para prevenir la unión inespecífica en inmunoensayos. Por último, se

ha propuesto que el CM-Dextrano en el tampón podría competir por la unión de los componentes del suero, reduciendo la unión inespecífica en la superficie del sensor.

1.5.3. Regeneración de la superficie del sensor

La reutilización de la superficie sensora se consigue mediante su regeneración, disociando el complejo formado por el analito y el biorreceptor, quedando la superficie preparada para la siguiente medida. Dependiendo de la naturaleza de la molécula inmovilizada y bajo las condiciones de regeneración adecuadas, una misma superficie sensora puede ser utilizada cientos e incluso miles de veces. El objetivo, en el caso de los inmunosensores es la ruptura de la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, a la cual contribuyen diferentes fuerzas, que pueden ser alteradas mediante diversas estrategias [89]. Es de gran utilidad para este propósito la experiencia de la cromatografía de afinidad [90], que puede guiar los pasos para alcanzar una regeneración adecuada, ya que aunque algunas condiciones como el tiempo de contacto o la superficie no son iguales, el fundamento biomolecular es el mismo.

Tabla 1.6. Disoluciones de regeneración más utilizadas

Ácidas	HCl, pH 1-3 glicina-HCl, pH 1.5-3 ácido fórmico, pH 2-3 ácido fosfórico, pH 1.5-2.5
Básicas	NaOH, pH 11-13 glicina-NaOH, pH 9-10 etanolamina 8.5-10.5
Iónicas	NaCl 0.5-5 M MgCl ₂ 1-4 M
Caotrópicas	cloruro de guanidina 6M urea 6-8 M KSCN 3 M
Disolventes	acetonitrilo 30 %
Surfactantes	Tween 20 0.1%-0.5% SDS 0.02-0.5%

Para que se mantenga la reproducibilidad del sistema es necesario que la disociación del complejo sea total y que las características de la molécula inmovilizada no se vean afectadas. Generalmente la regeneración se lleva a cabo mediante cambios bruscos de pH con disoluciones ácidas, de $\text{pH} < 2,5$, o básicas, con $\text{pH} > 9$. Según la naturaleza de la unión se ha aplicado otros métodos de regeneración que utilizan disoluciones con alta fuerza iónica, agentes caotrópicos, detergentes o disolventes (Tabla 1.6). En algunos casos en los que la ruptura de la interacción es difícil y la actividad de la capa inmovilizada puede quedar comprometida, se puede hacer uso de disoluciones que combinen varios de los ingredientes mencionados, por lo que es necesario identificar y optimizar las condiciones apropiadas en cada situación [91].

1.5.4. Formatos de ensayo

Se han utilizado varios formatos en biosensores SPR para la detección de analitos químicos y biológicos (Fig. 1.19). El tipo de formato utilizado se debe escoger en función del tamaño del analito que se quiere detectar, las características de la interacción con el elemento de reconocimiento, el rango de concentraciones de analito que se ha de analizar y la matriz de la muestra. Los formatos más frecuentemente utilizados son el ensayo directo, el ensayo sándwich, el ensayo competitivo y el ensayo de inhibición.

En el formato de ensayo directo, el elemento de reconocimiento, generalmente un anticuerpo, se inmoviliza en la superficie del sensor y la detección del analito en disolución se lleva a cabo mediante el cambio de índice de refracción producido por la interacción. Este formato sólo se puede utilizar para detectar macromoléculas ($> 10\text{kDa}$). Es posible detectar moléculas más pequeñas, pero en ese caso la sensibilidad es peor, ya que producen un cambio más pequeño en el índice de refracción, por lo que el rango de trabajo queda limitado a concentraciones elevadas. Además, la inmovilización de anticuerpos presenta algunos problemas, como la posible pérdida de funcionalidad del anticuerpo inmovilizado, la sensibilidad de los sitios de unión a las condiciones de regeneración del dispositivo o la falta de control sobre la orientación, que hace que muchos de los sitios de unión queden inhabilitados para la interacción. En este formato

es posible llevar a cabo la medida mediante dos aproximaciones. La aproximación más utilizada consiste en cuantificar el analito mediante el incremento de señal producido después de un tiempo de contacto determinado. La aproximación alternativa se basa en la capacidad de los biosensores SPR para llevar a cabo el seguimiento de la interacción en tiempo real. En este caso se utiliza la velocidad de unión del analito al elemento de reconocimiento inmovilizado en la superficie durante los instantes iniciales de la interacción.

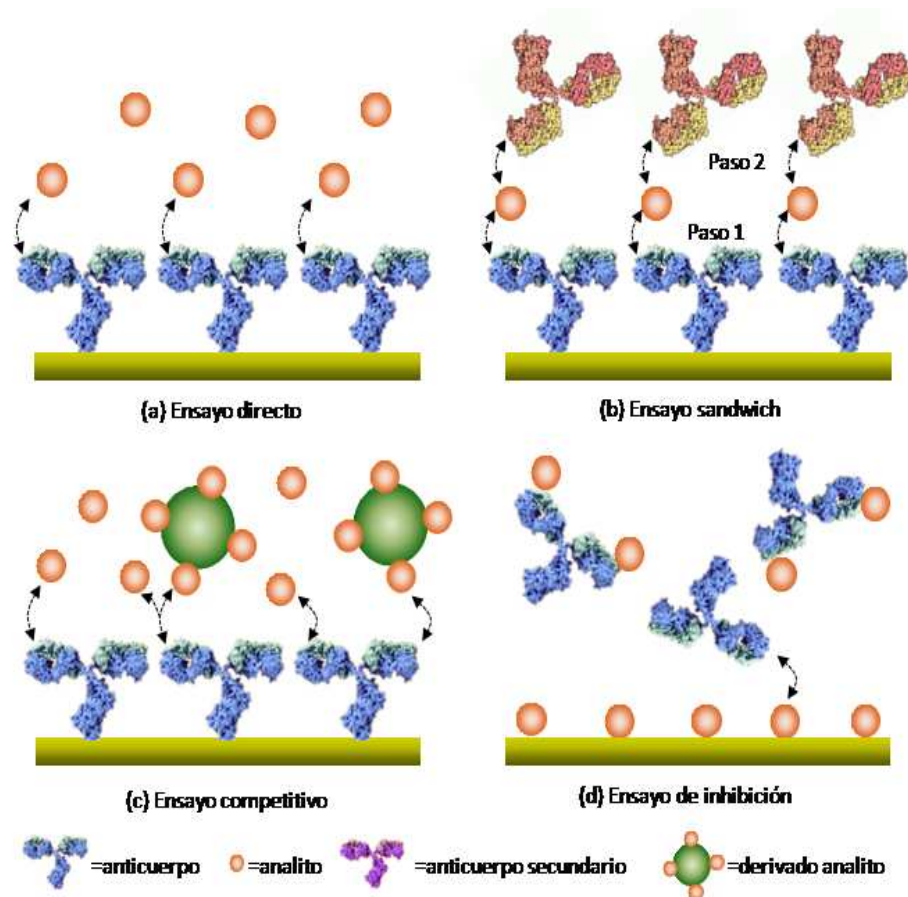


Fig. 1.19. Representación esquemática de los principales formatos de ensayos SPR

El formato sándwich proporciona una fórmula para aumentar la señal, consiguiendo una mejor sensibilidad y mejorando la selectividad del ensayo. En este caso, al igual que en el formato directo, el analito interacciona con el anticuerpo inmovilizado en la superficie del sensor, pero posteriormente, se introduce un

anticuerpo secundario que se une al analito, elevando la respuesta y aumentando la selectividad, ya que proporciona una confirmación adicional de la detección. Este ensayo comprende, por tanto, dos etapas de interacción de las que se puede obtener información adicional, aunque necesita un mayor tiempo de análisis. Este formato está restringido a macromoléculas (> 5 kDa), ya que las moléculas más pequeñas no pueden presentar en su estructura más de un sitio antigénico.

En el caso de analitos de bajo peso molecular (< 5 kDa), que no generan un cambio suficiente en el índice de refracción, la detección puede llevarse a cabo mediante los formatos competitivo y de inhibición. En el formato competitivo, el elemento de reconocimiento, se haya inmovilizado en la superficie. Se añade en cada muestra un derivado del analito de alto peso molecular. Una vez introducida la muestra en el sensor, se establece una competición entre el analito y el derivado de alto peso molecular por la unión al receptor en la superficie. Debido a que el sensor sólo es capaz de detectar el derivado de alto peso molecular, la señal es inversamente proporcional a la concentración del analito presente en la muestra. En cuanto al formato de inhibición, el analito o un derivado del analito, se encuentra inmovilizado en la superficie. Se añade una cantidad fija de una molécula complementaria de alto peso molecular, generalmente un anticuerpo, a todas las muestras. Tras un periodo de incubación, la mezcla se inyecta en el sensor, de manera que solo los anticuerpos libres se unen a la superficie, generando una respuesta inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

1.5.5. Aplicaciones de biosensores SPR

Las aplicaciones de los biosensores SPR pueden dividirse en dos áreas generales:

- Caracterización y cuantificación de interacciones biomoleculares. Los biosensores SPR son unos de los sistemas utilizados con más frecuencia en esta área. Se puede encontrar una valiosa información al respecto en varios libros y revisiones [58-64].
- La detección de especies químicas y biológicas. En adelante nos centraremos en las aplicaciones de los biosensores SPR en esta área. Estos dispositivos se

han aplicado en diferentes campos como el diagnóstico clínico, el seguimiento medioambiental, la industria alimentaria y la seguridad [30].

El desarrollo de biosensores SPR en el campo medioambiental [30, 31] se ha centrado sobre todo en la detección de pesticidas como la atrazina, la simazina, clorpirifos, carbaril y diclorodifeniltricloroetano (DDT). Se han desarrollado métodos para la detección mediante biosensores SPR de otros analitos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT); hidrocarburos aromáticos, como el 2-hidroxibifenilo (HBP) y el benzo[a]pireno (BaP); metales pesados, como el Cu^{2+} y Ni^{2+} ; fenoles, como el bisfenol A (BPA) o el 2,4-diclorofenol; bifenilos policlorados, como el 3,3',4,4',5-pentacolorobifenilo (PCB) y dioxinas, como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). La mayoría de estos métodos se han llevado a cabo en disoluciones tampón y aún no han demostrado su funcionamiento en muestras reales. Algunos de ellos permiten determinar las concentraciones establecidas por las legislaciones correspondientes y se correlacionan de forma excelente con los métodos de referencia.

Los analitos en el campo de la industria y seguridad alimentaria [30, 32, 33] han sido los que han recibido una mayor atención en los últimos años. El mayor esfuerzo se ha llevado a cabo en la detección mediante SPR de organismos patógenos [92] como las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* en alimentos, aunque también se ha realizado avances en la detección de toxinas, residuos de medicamentos veterinarios [93], vitaminas, hormonas y alérgenos [94]. Ya hemos comentado anteriormente la dificultad que supone para este tipo de biosensores la unión inespecífica de sustancias presentes en la matriz de análisis. Muchas de estas determinaciones se han llevado a cabo en matrices alimentarias muy complejas como leche, miel, zumo de frutas o tejidos animales, aunque generalmente han utilizado previamente complejos procesos de tratamiento previo de la muestra que incluyen extracción, ultrafiltración o centrifugación, entre otros.

La detección de marcadores biológicos indicadores de diferentes tipos de enfermedades es uno de los principales retos de la química bioanalítica. Los biosensores SPR han demostrado su utilidad en la detección de analitos relacionados con el diagnóstico [30], como marcadores de cáncer, alergias, dolencias cardiacas, fármacos y hormonas.

Entre los marcadores de cáncer, el antígeno prostático específico (PSA) es uno de los más estudiados al constituir el marcador principal de cáncer de próstata, por lo que su detección ha recibido gran atención en el campo de los biosensores [95] y en concreto en los biosensores SPR. Se han desarrollado métodos mediante biosensores SPR para la determinación de otros marcadores de cáncer como la proteína interleuquina-8 (IL-8) el antígeno carbohidrato (CA 19-9) o el antígeno carcinoembrionario (CAE).

La detección de anticuerpos contra patógenos virales mediante biosensores SPR ha tenido también un gran desarrollo, especialmente para la detección de anticuerpos específicos del virus de la hepatitis. También se ha llevado a cabo la detección de anticuerpos contra el virus del herpes simple tipo 1 y tipo 2 o el virus Epstein-Barr. La determinación de fármacos como la heroína, la morfina y la warfarina son también de gran interés en el análisis por biosensores SPR. Otra área del diagnóstico que genera bastante interés es la determinación de hormonas. La gonadotropina coriónica humana ha sido durante mucho tiempo un analito habitual en el desarrollo de todo tipo de biosensores. Esta hormona es un marcador de cáncer y del embarazo. Por último, se puede destacar la detección del marcador de daño muscular cardíaco troponina I (cTn-I).

Como resumen, podemos destacar que a pesar del gran esfuerzo dedicado al desarrollo de biosensores SPR no se pueden encontrar muchas aplicaciones que midan analitos de interés clínico en muestras reales a niveles de concentración adecuados y de forma rápida, con los mínimos pasos de pretratamiento o amplificación de la señal. Casi todas las aplicaciones comentadas anteriormente han sido llevadas a cabo en disoluciones tampón y su funcionamiento en fluidos biológicos no se ha demostrado. Aunque se han realizado muchos progresos, aún no se ha conseguido la detección de un analito a niveles de concentración relevantes en suero sin pretratamiento [30].

1.6. Referencias

1. Pierce, J.G. and T.F. Parsons, *Glycoprotein Hormones: Structure and Function*. Annual Review of Biochemistry, 1981. **50**(1): p. 465-495.
2. *Laboratory Medicine Practice Guidelines: Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease*, L.M. Demers and C.A. Spencer, Editors. 2002, National Academy of Clinical Biochemistry.
3. Spencer, C.A., M. Takeuchi, and M. Kazarosyan, *Current status and performance goals for serum thyrotropin (TSH) assays*. Clinical Chemistry, 1996. **42**(1): p. 140-5.
4. Rose, S.R., et al., *Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism*. Pediatrics, 2006. **117**(6): p. 2290-2303.
5. Rose, M.P., R.E. Gaines Das, and A.H. Balen, *Definition and measurement of follicle stimulating hormone*. Endocrine reviews, 2000. **21**(1): p. 5-22.
6. Kalia, V., A.N. Jadhav, and K. Bhutani, *Luteinizing hormone estimation*. Endocrine research, 2004. **30**(1): p. 1-17.
7. Baumann, G., *Growth-Hormone Heterogeneity - Genes, Isohormones, Variants, and Binding-Proteins*. Endocrine Reviews, 1991. **12**(4): p. 424-449.
8. Popii, V. and G. Baumann, *Laboratory measurement of growth hormone*. Clinica Chimica Acta, 2004. **350**(1-2): p. 1-16.
9. Bidlingmaier, M. and C.J. Strasburger, *Growth hormone assays: current methodologies and their limitations*. Pituitary, 2007. **10**(2): p. 115-119.
10. Miles, L.E. and C.N. Hales, *Immunoradiometric assay of human growth hormone*. Lancet, 1968. **2**(7566): p. 492-3.
11. Chapman, I.M., *Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1994. **78**(6): p. 1312-1319.
12. Reutens, A.T., *Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1995. **80**(2): p. 480-485.
13. Rigamonti, A.E., et al., *Growth hormone abuse: methods of detection*. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2005. **16**(4): p. 160-166.
14. Wallace, J., et al., *Changes in non-22-kilodalton (kDa) isoforms of growth hormone (GH) after administration of 22-kDa recombinant human GH in trained adult males*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001. **86**(4): p. 1731-1737.
15. Wood, P., *Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization*. Annals of Clinical Biochemistry, 2001. **38**: p. 471-482.
16. von Lode, P., *Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods*. Clinical Biochemistry, 2005. **38**(7): p. 591-606.
17. D'Orazio, P., *Biosensors in clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2003. **334**(1-2): p. 41-69.
18. Lippa, P., L. Sokoll, and D. Chan, *Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2001. **314**(1-2): p. 1-26.
19. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
20. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods*. Nature, 1959. **184**(4699): p. 1648-1649.
21. Gosling, J.P., *A decade of development in immunoassay methodology*. Clinical Chemistry, 1990. **36**(8): p. 1408-1427.
22. Wu, A.H.B., *A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2006. **369**(2): p. 119-124.
23. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 2000. **366**(6-7): p. 540-551.
24. Turner, A.P.F., I. Karube, and G.S. Wilson, *Biosensors: Fundamentals and Applications*. 1989: Oxford University Press.
25. Clark, L.C. and C. Lyons, *Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(1): p. 29-&.
26. Updike, S.J. and G.P. Hicks, *The Enzyme Electrode*. Nature, 1967. **214**(5092): p. 986-988.

27. Connolly, P., *Clinical diagnostics opportunities for biosensors and bioelectronics*. Biosensors and Bioelectronics, 1995. **10**(1-2): p. 1-6.
28. Morgan, C.L., D.J. Newman, and C.P. Price, *Immunosensors: Technology and opportunities in laboratory medicine*. Clinical Chemistry, 1996. **42**(2): p. 193-209.
29. Borisov, S.M. and O.S. Wolfbeis, *Optical biosensors*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 423-461.
30. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 462-93.
31. Rodriguez-Mozaz, S., M.J. Lopez de Alda, and D. Barceló, *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **386**(4): p. 1025-1041.
32. Mello, L.D. and L.T. Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. Food Chemistry, 2002. **77**(2): p. 237-256.
33. Patel, P.D., *(Bio) sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review*. Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**(2): p. 96-115.
34. Cooper, M., *Biosensor profiling of molecular interactions in pharmacology*. Current Opinion in Pharmacology, 2003. **3**(5): p. 557-562.
35. Cooper, M., *Optical biosensors in drug discovery*. Nature Reviews in Drug Discovery, 2002. **1**(7): p. 515-528.
36. Gooding, J.J., *Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends*. Analytica Chimica Acta, 2006. **559**(2): p. 137-151.
37. Gronow, M., *Biosensors*. Trends in Biochemical Sciences, 1984. **9**(8): p. 336-340.
38. Hock, B., *Antibodies for immunosensors - A review*. Analytica Chimica Acta, 1997. **347**(1-2): p. 177-186.
39. Ye, L. and K. Haupt, *Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **378**(8): p. 1887-1897.
40. O'Sullivan, C.K., *Aptasensors--the future of biosensing?* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002. **372**(1): p. 44-8.
41. Thévenot, D.R., et al., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**(1-2): p. 121-131.
42. Janshoff, A., H.J. Galla, and C. Steinem, *Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors - An Alternative to Optical Biosensors?* Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**: p. 4004-4032.
43. Carrascosa, L.G., et al., *Nanomechanical biosensors: a new sensing tool*. TrAC -Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(3): p. 196-206.
44. Fritz, J., *Cantilever biosensors*. The Analyst, 2008. **133**(7): p. 855-863.
45. Lechuga, L.M., *Micro- and nanoimmunosenors: technology and applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(1): p. 44-6.
46. Lechuga, L.M., *Optical biosensors*, in *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, L. Gorton, Editor. 2005, Elsevier Science BV: Amsterdam.
47. Fan, X., et al., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review*. Anal Chim Acta, 2008. **620**(1-2): p. 8-26.
48. Heideman, R.G., R.P.H. Kooyman, and J. Greve, *Performance of a highly sensitive optical waveguide Mach-Zehnder interferometer immunosensor*. Sensors and actuators. B, Chemical, 1993. **10**(3): p. 209-217.
49. Lechuga, L.M., F. Prieto, and B. Sepúlveda, *Interferometric Biosensors for environmental pollution detection*. Optical Sensors: Industrial, Environmental and Diagnostic Applications, 2004: p. 227.
50. Blanco, F.J., et al., *Microfluidic-optical integrated CMOS compatible devices for label-free biochemical sensing*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2006. **16**(5): p. 1006.
51. Otto, A., *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. Zeitschrift für Physik A 1968. **216**(4): p. 398-410.
52. Kretschmann, E. and H. Raether, *Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light*. Zeitschrift für Naturforschung A, 1968. **23**: p. 2135-2136.
53. Gordon, J.G. and S. Ernst, *Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface*. Surface Science, 1980. **101**(1-3): p. 499-506.

-
54. Nylander, C., B. Liedberg, and T. Lind, *Gas detection by means of surface plasmon resonance*. Sensors and Actuators, 1982. **3**: p. 79–88.
 55. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*. Sensors and Actuators, 1983. **4**: p. 299–304.
 56. Raether, H., *Surface plasma oscillations and their applications*, in *Physics of Thin Films*. 1977, Academic Press: New York. p. 145–261.
 57. Hutley, M.C., *Diffraction gratings*, in *Techniques of Physics*. 1982, Academic Press: London.
 58. Homola, J., *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. 2006, Berlin: Springer.
 59. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2001. **14**(5): p. 273-94.
 60. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2002. **15**(6): p. 352-376.
 61. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2003. **16**(6): p. 351-82.
 62. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2005. **18**(6): p. 431-78.
 63. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2005. **18**(1): p. 1-39.
 64. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2006. **19**(6): p. 478.
 65. McDonnell, J.M., *Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition*. Current Opinion in Chemical Biology, 2001. **5**(5): p. 572-577.
 66. Heyse, S., et al., *Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes, 1998. **1376**(3): p. 319-338.
 67. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
 68. Wink, T., et al., *Self-assembled monolayers for biosensors*. Analyst, 1997. **122**(4): p. R43-R50.
 69. Bain, C. and G. Whitesides, *Molecular-level control over surface order in self-assembled monolayers films of thiols on gold*. Science, 1988. **240**(4848): p. 62-63.
 70. Spinke, J., et al., *Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers*. Langmuir, 1993. **9**(7): p. 1821-1825.
 71. Spinke, J., et al., *Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization*. Journal of Chemical Physics, 1993. **99**: p. 7012.
 72. Ostuni, E., L. Yan, and G.M. Whitesides, *The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999. **15**(1): p. 3-30.
 73. Lofas, S. and B. Johnsson, *A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface-Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands*. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, 1990(21): p. 1526-1528.
 74. Lofas, S., *Dextran Modified Self-Assembled Monolayer Surfaces for Use in Biointeraction Analysis with Surface-Plasmon Resonance*. Pure and Applied Chemistry, 1995. **67**(5): p. 829-834.
 75. O'Shannessy, D.J., M. Brigham-Burke, and K. Peck, *Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector*. 1992. **205**(1): p. 132-136.
 76. Lahiri, J., et al., *A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(4): p. 777-790.
 77. Masson, J.-F., et al., *Biocompatible polymers for antibody support on gold surfaces*. Talanta, 2005. **67**(5): p. 918-925.
 78. Fong, C.C., et al., *Effect of hydrogel matrix on binding kinetics of protein-protein interactions on sensor surface*. Analytica Chimica Acta, 2002. **456**(2): p. 201-208.
 79. Green, N.M., *Avidin and streptavidin*, in *Methods in Enzymology*. 1990, Academic Press. p. 51-67.
 80. Wilchek, M. and E.A. Bayer, *The avidin-biotin complex in bioanalytical applications*. Analytical Biochemistry, 1988. **171**(1): p. 1-32.
-

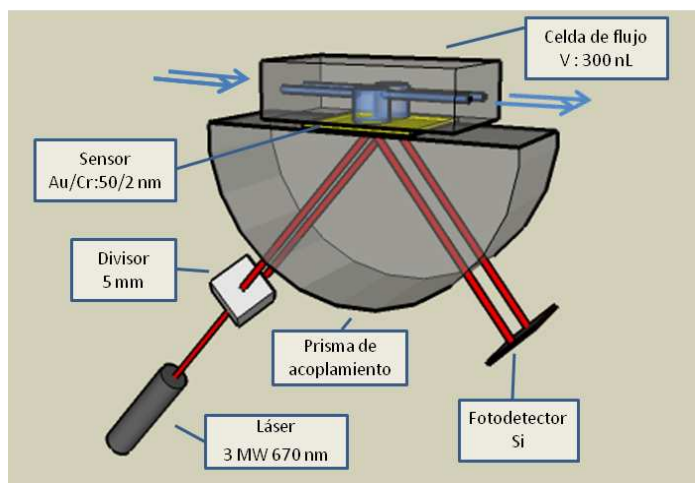
81. Haussling, L., et al., *Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers on Gold - Surface-Plasmon Optical Studies of Specific Recognition Reactions*. Langmuir, 1991. **7**(9): p. 1837-1840.
82. Jung, L., et al., *Surface plasmon resonance measurement of binding and dissociation of wild-type and mutant streptavidin on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers*. Sensors & Actuators: B. Chemical, 1999. **54**(1-2): p. 137-144.
83. Mrksich, M. and G.M. Whitesides, *Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells*. Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure, 1996. **25**: p. 55-78.
84. Frederix, F., et al., *Reduced nonspecific adsorption on covalently immobilized protein surfaces using poly (ethylene oxide) containing blocking agents*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004. **58**(1): p. 67-74.
85. Ayela, C., et al., *Antibody-antigenic peptide interactions monitored by SPR and QCM-DA model for SPR detection of IA-2 autoantibodies in human serum*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(12): p. 3113-3119.
86. Cao, C., et al., *A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen-alpha1-antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**(11): p. 2106-13.
87. Johnsson, L., et al., *Reduction of Sample Matrix Effects-The Analysis of Benzimidazole Residues in Serum by Immunobiosensor*. Food and Agricultural Immunology, 2002. **14**(3): p. 209-216.
88. Johansson, M.A. and K.E. Hellenäs, *Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum*. The Analyst, 2004. **129**(5): p. 438-442.
89. Vanoss, C.J., *Hydrophobic, Hydrophilic and Other Interactions in Epitope Paratope Binding*. Molecular Immunology, 1995. **32**(3): p. 199-211.
90. Yarmush, M.L., et al., *Immunoabsorption - Strategies for Antigen Elution and Production of Reusable Adsorbents*. Biotechnology Progress, 1992. **8**(3): p. 168-178.
91. Andersson, K., M. Hamalainen, and M. Malmqvist, *Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(13): p. 2475-2481.
92. Bergwerff, A.A. and F. van Knapen, *Surface plasmon resonance biosensors for detection of pathogenic microorganisms: strategies to secure food and environmental safety*. Journal of AOAC International, 2006. **89**(3): p. 826-31.
93. Haughey, S.A. and G.A. Baxter, *Biosensor screening for veterinary drug residues in foodstuffs*. Journal of AOAC International, 2006. **89**(3): p. 862-7.
94. Yman, I.M., et al., *Food Allergen Detection with Biosensor Immunoassays*. Journal of AOAC International, 2006. **89**(3): p. 856-861.
95. Healy, D.A., et al., *Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection*. Trends in Biotechnology, 2007. **25**(3): p. 125-131.

2. Materiales y métodos

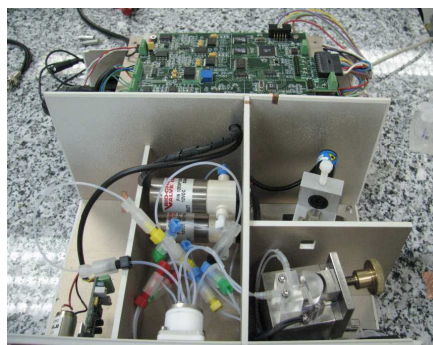
2.1. Descripción del biosensor de resonancia de plasmón superficial.

En este trabajo se ha empleado un biosensor de SPR desarrollado en nuestro grupo y comercializado por la empresa derivada de él, Sensia, SL. Éste dispositivo utiliza la configuración de Kretchman mediante el método de medida consistente en registrar la intensidad de la luz reflejada mientras se mantiene un ángulo de incidencia fijo. En este dispositivo (Fig. 2.1a), la excitación del plasmón superficial se lleva a cabo mediante un diodo láser, modelo RS 194-032 (Amidata, España), que emite luz a una longitud de onda de 670 nm con una potencia de 3 mW. Para habilitar el uso de dos canales de medida, el haz láser se divide en dos haces de la misma intensidad mediante un divisor de haz, específicamente fabricado para este fin y que consiste en un cubo de 5 mm de lado mediante el cual se obtiene una separación de 3.1 mm entre los haces. Esta configuración permite realizar una medida en cada canal o bien utilizar uno de ellos como canal de referencia. Los dos haces de luz se hacen pasar por un prisma de

a).



b).



c).

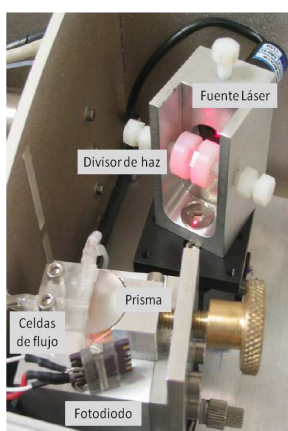


Figura 2.1. a) Esquema de la configuración del biosensor SPR de Sensia. b) Fotografía general del equipo y detalle del módulo sensor, el láser, el sistema fluidoico y la electrónica. c) Detalle de la configuración óptica y la celda de flujo.

acoplamiento óptico con un índice de refracción $n = 1.52$ a través del cual, la luz incide en la parte posterior de una placa de cristal de 10 mm x 10 mm metalizada con una capa de 2 nm de cromo y 50 nm de oro (Ssens, Holanda) que se encuentra en contacto con el prisma por medio de un aceite de acoplamiento del mismo índice de refracción. La parte metalizada de la placa está en contacto a su vez con dos cubetas de flujo por las que se hace fluir las disoluciones que se pretenden analizar. En esta configuración, el conjunto formado por la superficie sensora, el prisma, las celdas de flujo y el dispositivo fotodetector, se encuentran acoplados sobre una superficie giratoria con una resolución angular de 0.01° .

El sistema de microfluídica del biosensor está formado por las celdas de flujo y por el conjunto de bombas y conexiones que impulsan las muestras líquidas a la superficie del sensor. Las celdas de flujo están fabricadas en metacrilato mediante mecanizado y dispuestas en dirección vertical tal como indica la Fig. 2.1c. Las dimensiones de las cubetas son 2 mm de diámetro y 0,1 mm de profundidad y se encuentran separadas por una distancia de 1 mm. El sellado de la celda se lleva a cabo mediante una junta tórica de Viton. El prisma se sitúa detrás de la placa sensora, utilizando el aceite del mismo índice de refracción y se asegura el sellado mediante la presión producida por el mecanismo de ajuste. De esta manera quedan formadas las dos celdas de flujo con un volumen aproximado de 300 nL cada una.

Las celdas de flujo están conectadas a un preciso sistema de distribución de fluidos compuesto por una bomba peristáltica, una bomba de inyección, dos válvulas y un circuito de tubos de teflón, que hacen llegar las diferentes disoluciones a la superficie del sensor. La bomba peristáltica consta de dos canales independientes, uno para cada celda, trabaja a velocidad variable, entre 3 y 3000 $\mu\text{L}/\text{min}$ y se emplea para mantener un flujo constante sobre la superficie del sensor. En éste trabajo, dependiendo de las diferentes necesidades de cada proceso se han utilizado velocidades de flujo en el intervalo de 10 – 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La función de la bomba de inyección es introducir mediante pulsos las muestras en el flujo continuo de disolución también a través de una válvula de inyección. La válvula de inyección presenta dos posiciones, de carga y de inyección. En la posición de carga, la bomba de inyección llena un bucle de tubo de teflón de un volumen determinado. Éste volumen puede ser modificado para diferentes

aplicaciones mediante la selección de una longitud de bucle adecuada. En éste trabajo se ha utilizado un bucle de tubo que proporciona un volumen de inyección de 220 μL . La introducción de volúmenes inferiores puede llevarse a cabo interrumpiendo la inyección tras un tiempo determinado. En la posición de inyección, el volumen cargado en el bucle se dirige hacia la celda de flujo impulsado por la bomba peristáltica.

La adquisición de la señal se lleva a cabo por medio de un fotodiodo de dos cuadrantes S5870 (Hamamatsu, Japón) y la electrónica necesaria para la captura, amplificación y filtrado de la señal. El software del instrumento (Fig 2.2), implementado en Labview 7.1 (Nacional Instruments, EEUU), facilita el manejo del instrumento, permitiendo controlar los sistemas de microfluídica, adquisición de datos y representación de la señal durante el transcurso de la operación. La adquisición de datos puede llevarse a cabo en el modo de barrido de ángulo o manteniendo un ángulo de incidencia fijo. El tratamiento de los datos se ha realizado con el programa Origin 7.5 (OriginLabs, EEUU) mediante la importación de ficheros de texto ASCII.

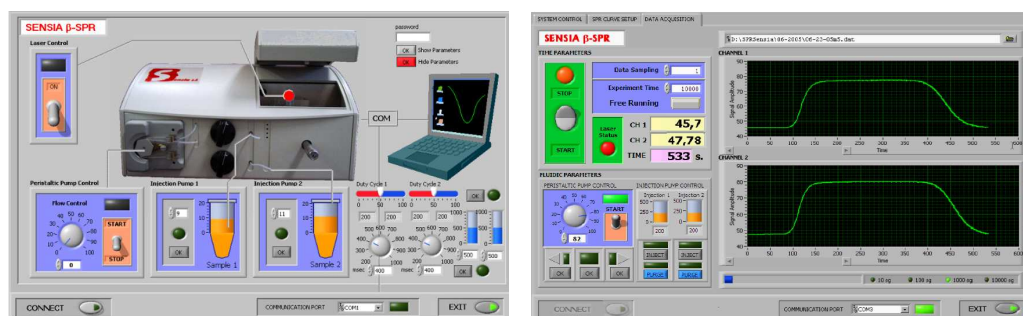


Figura 2.2. Ventanas de control y adquisición de datos del software del instrumento

2.2. Reactivos

Los productos utilizados en la limpieza de la placa del sensor, tricloroetileno, acetona, etanol, ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). Los alcanotioles ácido mercaptoundecanóico, ácido mercaptohexadecanóico y mercaptoundecanol, los reactivos de activación 1-etil-3-(3

dimetil-aminopropil) carbodiimida y N-hidroxisulfosuccinimida, la estreptavidina, la hidracina, el metaperiodato sódico y el carboximetil-dextrano se adquirieron en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Todos los ingredientes utilizados en la preparación de las diferentes disoluciones tampón incluidas en este trabajo fueron proporcionados por Panreac (Barcelona, España). El hidrocloreto de etanolamina se obtuvo de Acros Organics (Geel, Belgium). El surfactante Tween 20 se adquirió en Quantum Appligene (Heidelberg, Germany). Los reactivos de biotilación NHS-LC-Biotina y Biotina-LC-Hidracida fueron suministrados por Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois, EEUU). El suero de conejo y humano se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

2.3. Hormonas y anticuerpos

La hGH utilizada en este trabajo es de tipo recombinante, compuesta exclusivamente por la isoforma hGH 22 kDa y ha sido obtenida de Pfizer, España. Las hormonas hFSH, hLH y hTSH son de origen pituitario y fueron proporcionadas por el Dr. Parlow del *National Hormone & Peptide Program* (NHPP) del *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (NIDDK) de Torrance, California. La hFSH, con referencia NIDDK-hFSH-I-SIAFP-2, AFP-7220C, presenta 14296 IU/mg en relación al estándar de la WHO 2nd IRP-HMG. La hLH con referencia NIDDK-hLH-I-SIAFP-2, AFP-4395A, presenta 8444 IU/mg en relación al estándar de la WHO 1st IRP 68/40. La hTSH con referencia NIDDK-hTSH-SIAFP-B-2, AFP-3951A, presenta 7.54 IU/mg en relación a hTSH altamente purificada.

Todos los anticuerpos monoclonales (mAb) empleados en este trabajo han sido obtenidos y caracterizados en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los mAbs fueron obtenidos a partir de ratones inmunizados con las distintas hormonas. Aquellos ratones, cuyo suero presentaba un mayor título frente al antígeno, fueron seleccionados para experimentos de fusión celular, con el objeto de inmortalizar las células productoras de los anticuerpos de interés [1]. En dichos experimentos se emplearon las células provenientes de los bazo o ganglios linfáticos de los animales inmunizados en cuyo suero se encontró una respuesta específica frente a las hormonas.

Dichas células fueron fusionadas con el mieloma P3X63-Ag8.653 utilizando polietilenglicol (PEG) mediante los protocolos previamente descritos [1].

Tabla 2.1. Anticuerpos seleccionados para el ensayo SPR

mAb	Especificidad	Afinidad (nM)	Isotipo
hFSH-1	hFSH	5.00	IgG1
hFSH-2	hFSH	4.50	IgG1
hFSH-4	hFSH	10.00	IgG1
hFSH-5	hFSH	7.00	IgG1
hFSH-9	hFSH	ND	IgG1
hFSH-14	hFSH	5.50	ND
hLH-1	hLH	0.80	IgG1
hLH-2	hLH	20.00	IgG1
hLH-3	hLH	15.00	IgG1
hLH-4	hLH	0.05	IgG1
hLH-6	hLH	30.00	IgG1
hLH-7	hLH	70.00	IgG1
hTSH-1	hTSH	2.00	IgG1
hTSH-2	hTSH	15.00	IgG1
hTSH-3	hTSH	10.00	IgG1
hCG-4	Subunidad α común	<0.01	IgG1
hCG-21	Subunidad α común	20.00	IgG1
hCG-24	Subunidad α común	0.65	IgG1
hGH12	hGH (22K, 20K)	3.00	IgG1

Se analizó la presencia de anticuerpos específicos dirigidos frente a los antígenos empleados en los sobrenadantes de cultivo de los híbridos que crecieron, mediante técnicas de enzoinmunoensayo (EIA) y los híbridos positivos se clonaron por dilución límite. La subclase de los anticuerpos se determinó por EIA usando anticuerpos específicos marcados con peroxidasa (Southern Biotechnology, EEUU). Los anticuerpos monoclonales fueron purificados por precipitación con sulfato de amonio [1] a partir de los correspondientes líquidos ascíticos. La afinidad y especificidad de los

anticuerpos se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) y EIA. Entre los anticuerpos disponibles se eligieron varios para cada antígeno en función de sus características de especificidad y afinidad (Tabla 2.1).

El anticuerpo hGH-12 se purificó adicionalmente mediante cromatografía de afinidad en una columna cromatográfica preparativa con el antígeno inmovilizado. Se utilizó el medio preactivado CNBr Sefarosa 4B (Amersham Biosciences, Sweden). La preparación del medio y el acoplamiento del antígeno se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se prepararon 7.9 mg del antígeno en 5 mL de tampón carbonato (100 mM carbonato, 500 mM NaCl, pH 8.3) y se mezclaron con el medio durante toda la noche a 4°C en agitación suave. Seguidamente se llevó a cabo el lavado y bloqueo del medio. Posteriormente, se introdujeron en la columna 2 mL de mAb hGH-12 a una concentración de proteína de 15 mg/mL en disolución tampón TBS (50mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8). La mezcla se mantuvo en agitación suave durante 16 h a 4°C. El anticuerpo se eluyó de la columna con disolución tampón acetato (50 mM acetato, 150 mM NaCl, pH 4.3). Posteriormente se dializó la disolución resultante frente a tampón PBS (10 mM de fosfato pH 7.4 con 137 mM de NaCl y 2.7 mM KCl).

2.4. Formación de las SAM

Todas las placas sensoras se sometieron, previamente a su uso, a un procedimiento de limpieza consistente en sucesivos lavados con ultrasonidos en tricloroetileno, acetona, etanol y agua antes de sumergirse en $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1 durante 15 segundos. Posteriormente se lavaron en agua con ultrasonidos, se secaron con nitrógeno y se situaron en el sistema.

Basándonos en la experiencia previa del grupo [2], la inmovilización covalente de las diferentes biomoléculas se llevó a cabo mediante SAMs de alcanotioles. Para la inmovilización de las hormonas se utilizaron SAMs de ácido mercaptoundecanóico (MUA), formadas a partir de disoluciones de MUA 50 μM en etanol. En el estudio de la inmovilización de anticuerpos, se probaron SAMs mixtas compuestas por diferentes proporciones de ácido mercaptohexadecanóico (MHDA) y mercaptoundecanol (MUOH) a partir de disoluciones con una concentración total de alcanotiol de 250 μM

en etanol. La formación de las SAMs se llevó a cabo in situ a mediante la inyección de las disoluciones de los alcanotioles correspondientes en etanol a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente se limpió el exceso de alcanotiol con etanol y se estableció un flujo continuo de agua MilliQ durante los siguientes pasos del proceso de inmovilización.

2.5. Inmovilización de las hormonas

Las hormonas implicadas en este trabajo se inmovilizaron en la superficie funcionalizada con la SAM de MUA a través del acoplamiento de los grupos amino presentes en éstas proteínas con los grupos carboxilo de las SAM mediante la activación producida por la 1-etil-3-(3 dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisulfosuccinimida (NHS).

Con el objetivo de optimizar el proceso de inmovilización, se buscaron las mejores condiciones de pH y concentración de la disolución de proteína. Para ello se llevaron a cabo experimentos previos en los que se hizo fluir sobre la superficie del sensor modificada con la SAM de MUA, y sin llevar a cabo la activación, diferentes disoluciones de las proteínas con una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (220 μL a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) variando el pH de la disolución dentro del rango de 3 a 8. Tras cada inyección de cada una de éstas disoluciones la superficie se regeneró con una disolución de NaOH 10 mM (30 μL a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$).

También se probaron diferentes concentraciones de hGH, en el intervalo entre 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con el objetivo de encontrar la concentración adecuada de proteína para la inmovilización. La posterior medida de la señal debida a la interacción del anticuerpo específico correspondiente con la proteína inmovilizada, proporciona una evaluación del recubrimiento superficial obtenido.

En resumen, el proceso de inmovilización de las hormonas sobre la SAM de MUA se llevó a cabo a través de los siguientes pasos:

- activación de la superficie carboxilada con una mezcla de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M (220 μL a 10 $\mu\text{L}/\text{min}$)

- introducción de la hormona correspondiente a la concentración y pH adecuados en cada caso (220 μ L a 10 μ L/min). Éste paso puede repetirse varias veces hasta alcanzar el nivel deseado
- bloqueo de los grupos activados que permanezcan sin reaccionar con etanolamina 1M a pH 8.5 (220 μ L a 10 μ L/min)
- acondicionamiento de la superficie con HCl 100 mM (30 μ L a 30 μ L/min) para desprender las proteínas que pudieran haber quedado unidas de forma no covalente.

2.6. Inmunoensayo SPR de inhibición

Tras el proceso de inmovilización, se evaluó la capacidad para la unión de los anticuerpos específicos de las capas formadas. De esta manera, también se valoraron los diferentes anticuerpos disponibles para elegir los que producen una señal adecuada en el sensor SPR. Se inyectaron (220 μ L a 20 μ L/min) disoluciones de los anticuerpos específicos con una concentración de 1 μ g/mL en PBST en cada uno de los sensores (10 mM de fosfato pH 7.4 con 137 mM de NaCl, 2.7 mM KCl y 0.05% de Tween 20). La regeneración de la superficie tras cada una de las medidas se llevó a cabo mediante una disolución de HCl 5 mM (220 μ L a 30 μ L/min).

Se llevaron a cabo inmunoensayos de inhibición para la determinación de las diferentes hormonas. Se prepararon curvas de calibrado con disoluciones estándar por triplicado de las hormonas correspondientes en el intervalo de concentración 10^{-4} - 100 μ g/mL y muestras blanco en PBST. Posteriormente, se mezclaron éstas disoluciones (1:1) con el anticuerpo correspondiente en PBST durante 10 min. Finalmente, las disoluciones se inyectaron secuencialmente en el sensor (220 μ L a 20 μ L/min) y se registró la señal de SPR en tiempo real.

La respuesta SPR de cada estándar se expresó como el porcentaje respecto a la respuesta máxima producida por la disolución de control [$100 \times (\text{SPR}_{\text{señal}}/\text{SPR}_{\text{señal,max}})$]. Las respuestas promediadas producidas por los tres estándares de cada concentración se representaron frente al logaritmo de la

concentración de la hormona y se ajustaron a la ecuación logística de cuatro parámetros:

$$y = \{D + (A - D) / [1 + (x / C)^B]\}$$

donde x es la concentración de hormona, y es la respuesta, A el máximo asintótico correspondiente a la señal en ausencia de analito, B es la pendiente en el punto de inflexión, C es el punto de inflexión, equivalente a la concentración de inhibición media I_{50} y D es el mínimo asintótico, correspondiente a la señal de fondo.

Utilizando este esquema de ensayo, se midieron curvas de calibrado en PBST con los diferentes anticuerpos para cada analito con el fin de elegir el que proporciona una mayor sensibilidad del ensayo. Para el ensayo de hTSH se evaluaron los anticuerpos hTSH-1, hTSH-2 y hTSH-3 en una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. En el caso de la hFSH se probaron disoluciones de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de hFSH-1, hFSH-2, hFSH-9 y hFSH-14. Por último, para la detección de hLH, los anticuerpos hLH-6 y hLH-7 se ensayaron a 0.05 $\mu\text{g/mL}$. Como se mencionó anteriormente, en el caso del ensayo de hGH se utilizó el anticuerpo hGH-12 en una concentración de 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

Se evaluó la especificidad de cada sensor por su hormona correspondiente fluyendo disoluciones (1 $\mu\text{g/mL}$) de los anticuerpos específicos del resto de las hormonas. Los anticuerpos hFSH-14, hLH-7 y hGH-12 se inyectaron en el sensor de hTSH; hTSH-1, hLH-7 y hGH-12 en el sensor de hFSH; hTSH-1, hFSH-14 y hGH-12 en el sensor de hLH y hTSH-1, hFSH-14 y hLH-7 en el sensor de hGH. También se comprobaron las reactividades cruzadas de los anticuerpos empleados en los diferentes ensayos utilizando mezclas de los anticuerpos específicos y analitos no específicos. Se probaron mezclas de hTSH-1 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y hFSH, hLH o hGH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en el sensor de hTSH; mezclas de hFSH-14 a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y hTSH, hLH o hGH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en el caso del sensor de hFSH; mezclas de hLH-7 a 0.05 $\mu\text{g/mL}$ y hTSH, hFSH o hGH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en el sensor de hLH y mezclas de hGH-12 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y hTSH, hFSH o hLH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en el sensor de hGH.

2.7. Optimización de las condiciones de trabajo con muestras de fluidos biológicos

Los estudios preliminares para llevar a cabo las medidas en suero se llevaron a cabo utilizando suero de conejo, una vez comprobado que el comportamiento en cuanto a su interacción con la superficie del sensor es idéntico al del suero humano. Para ello se mezclaron 110 μL de suero de conejo o de suero humano (1:1) con PBST, para simular las condiciones del ensayo de inhibición, y se inyectaron en el sensor de hGH (220 μL a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$) sin ningún otro tratamiento adicional para estudiar la unión inespecífica producida.

Para evaluar el efecto de la composición del tampón del ensayo sobre la unión inespecífica se prepararon doce disoluciones tampón PBST diferentes variando simultáneamente la fuerza iónica, el pH y el contenido de Tween 20. La fuerza iónica se modificó desde 137 mM de NaCl en PBST normal a 500 mM de NaCl. El pH se estableció en 6.5, 7.4 y 8. El Tween 20 se aumentó de 0.05% a 0.1%. Se mezclaron (1:1) 110 μL de suero de conejo con cada uno de estos doce tampones de ensayo y se inyectaron en el sensor de hGH (220 μL a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$) para registrar la señal producida por la unión inespecífica de los componentes de la matriz en la superficie. También se prepararon mezclas (1:1) de 110 μL de suero de conejo con el mAb hGH-12 a 0.25, 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST-S (PBST con 500 mM NaCl, Tween 20 al 0.1% y pH 8) y se inyectaron en el sensor de hGH (220 μL a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$). Se evaluaron las señales de SPR producidas para comprobar el efecto de la matriz de suero en la interacción del anticuerpo con la superficie.

También se comprobaron las condiciones de regeneración de la superficie del sensor tras cada medida de muestras de suero. Se prepararon diferentes disoluciones de regeneración variando simultáneamente factores como el pH (2, 2.3, 3, 11, 11.7, 12), la fuerza iónica (0, 0.5, 1, 2 M NaCl) y la concentración de Tween 20 (0, 0.05%, 0.1%). Se inyectaron éstas disoluciones (220 μL a 30 $\mu\text{L}/\text{min}$) para romper la interacción producida por una mezcla de suero de conejo (1:1) con mAb hGH-12 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBST-S.

También se comprobó el efecto del nivel de inmovilización de la hGH en la unión inespecífica. Para ello se prepararon diferentes superficies sensoras, siguiendo el protocolo de inmovilización descrito anteriormente en las que se varió la concentración de hGH para la inmovilización de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente, en cada una de estas superficies, se estableció un flujo continuo de PBST-S, se inyectó una mezcla (1:1) de 110 μL de suero de conejo con PBST-S y se registró la señal de SPR.

El efecto de la composición de la SAM también fue examinado. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se prepararon diferentes superficies sensoras con SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH en fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1 y 0.05, respectivamente. Sobre estas superficies, se llevó a cabo la inmovilización de hGH en las condiciones establecidas en el punto 2.5. Seguidamente, se estableció un flujo continuo de PBST-S y se inyectaron mezclas (1:1) de 110 μL de suero de conejo con PBST-S o con mAb hGH-12 a 2 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S y se registró la señal de SPR.

Por último, se comprobó el efecto de la adición del polisacárido carboximetil dextrano (CM-Dextrano). Para ello se prepararon mezclas (1:1) de 110 μL de suero de conejo con el tampón PBST-S al que se añadió CM-Dextrano a 1, 2 y 10 mg/mL , respectivamente, y se midieron en el sensor de hGH.

En el caso de las medidas en orina, se llevaron a cabo experimentos preliminares en los que se mezclaron 110 μL de orina (obtenida de voluntarios del laboratorio) en proporción 1:1 con PBST, para simular las condiciones del ensayo de inhibición, y se inyectaron en el sensor de hGH (220 μL a 20 $\mu\text{L/min}$) sin ningún otro tratamiento para estudiar la unión inespecífica producida. La regeneración de la superficie tras cada medida se llevó a cabo mediante la inyección de una disolución de HCl 5 mM (220 μL , 30 $\mu\text{L/min}$).

2.8. Inmunoensayo SPR de inhibición para la detección de hGH en suero

Se prepararon curvas de calibrado con disoluciones estándar por triplicado en suero humano con hGH en el rango de $4 \cdot 10^{-3}$ – 40 $\mu\text{g/mL}$, se mezclaron (1:1) durante

10 minutos con mAb hGH-12 a una concentración de 2 µg/mL en PBST-S y se inyectaron en el sensor (220 µL a 20 µL/min). Los controles se prepararon y procesaron de igual manera. La regeneración de la superficie tras cada medida se consiguió con una disolución de regeneración de NaCl 2M con el 0.1% de Tween 20 y pH 11 (220 µL a 30 µL/min). Las disoluciones se analizaron en el sensor de SPR y las curvas de calibrado se calcularon como se ha descrito anteriormente.

Posteriormente se analizaron muestras de suero de pacientes que participaron en pruebas de estimulación para el diagnóstico de deficiencia de hGH proporcionadas por la Dra. M. D. Rodríguez Arnau (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España). Se mezclaron (1:1) porciones (110 µL) de cada muestra durante 10 minutos con mAb hGH-12 a una concentración de 2 µg/mL en PBST-S y se inyectaron en el sensor sin ningún otro tratamiento. Todas las muestras fueron analizadas con el inmunosensor de hGH y mediante un método ELISA para validar los resultados del inmunosensor. Se llevó a cabo un ELISA tipo sándwich para la determinación de hGH usando el mAb hGH-27 como anticuerpo capturador y mAb-hGH-12 biotinilado como anticuerpo secundario como se ha descrito anteriormente [3].

2.9. Inmunoensayo SPR para la detección simultanea de hFSH y hLH en orina

Se prepararon estándares de calibración de hFSH y hLH y muestras control por triplicado en orina en el intervalo de concentración 10^{-4} - 100 µg/mL (110 µL). Se mezclaron con el anticuerpo correspondiente durante 10 minutos a una concentración en PBST de 0.05 µg/mL de mAb-hLH-7 para la hLH y 0.3 µg/mL de mAb-hFSH-14 para la hFSH y se inyectaron en el sensor correspondiente (220 µL a 20 µL/min). La regeneración de la superficie tras cada medida se consiguió mediante una disolución de HCl 5 mM (220 µL a 30 µL/min). Los estándares y los controles se analizaron con el biosensor SPR y se calcularon las curvas de calibrado como se ha descrito anteriormente.

2.10. Inmunoensayo SPR para la detección de hTSH en muestras reales

Se analizaron estándares de calibrado de hTSH (Wallac, Turku, Finlandia) en sangre seca sobre papel de filtro utilizados para la criba de hipotiroidismo neonatal. Se cortaron discos de 4.5 mm de diámetro de cada estándar, se introdujeron en 200 μ L de PBST o PBST-S y se agitaron suavemente (300 rpm) toda la noche a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron las disoluciones durante 5 minutos a 3000 rpm, se tomaron 110 μ L del sobrenadante y se mezclaron (1:1) con anticuerpo hTSH-1 a 0.1 μ g/mL en PBST-S. Las muestras utilizadas para cuantificar la unión inespecífica producida por los componentes de la matriz fueron mezcladas con PBST-S sin anticuerpo. Las disoluciones se analizaron en el sensor de SPR. La regeneración de la superficie tras cada medida se llevó a cabo utilizando una disolución de HCl 5 mM.

2.11. Optimización de la inmovilización de anticuerpos

2.11.1. Inmovilización covalente

Para este estudio, se probaron superficies sensoras con SAMs de diferente composición. Además de la SAM de MUA descrita anteriormente, se establecieron SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH en fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1, 0.05, 0.033, 0.02, 0.013 y 0.01, respectivamente. Todas estas SAMs se formaron siguiendo el protocolo descrito en el epígrafe 2.4. Se estableció un flujo continuo de agua MilliQ durante los siguientes pasos del proceso de inmovilización.

En cada una de estos sensores con las diferentes SAMs se inmovilizó el anticuerpo hGH-12 mediante acoplamiento amino. Se llevó a cabo la activación de la superficie carboxilada con la mezcla de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M (220 μ L a 10 μ L/min). Posteriormente se introdujo el mAb-hGH-12 a 10 μ g/mL en disolución tampón 10 mM de acetato a pH 4.5 (220 μ L a 10 μ L/min). Finalmente se bloqueó la superficie con etanolamina 1 M a pH 8.5 (220 μ L a 10 μ L/min). Una vez terminada la inmovilización del anticuerpo se estableció un flujo continuo de PBST y se examinó la

funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en PBST (220 μL a 20 $\mu\text{L/min}$).

Como alternativa al acoplamiento amino, también se procedió a la inmovilización del anticuerpo mediante sus grupos carbohidrato oxidados en superficies sensoras con las diferentes SAMs mencionadas. La oxidación del anticuerpo se llevó a cabo fuera del dispositivo SPR mezclando 250 μL de anticuerpo hGH-12 a 1 mg/mL en PBS con 250 μL de NaIO_4 20 mM en PBS durante 30 minutos a 4 $^\circ\text{C}$ y protegiendo de la luz. Posteriormente se dializó la disolución resultante frente a PBS para eliminar el exceso de reactivo. Los sensores con las diferentes SAMs se activaron con una mezcla de EDC 0.2 M y NHS 0.05 M (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) y seguidamente se trataron con una disolución 1 M de hidracina a pH 8.5 (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) y se bloqueó la superficie con 1 M de etanolamina a pH 8.5 (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$). Finalmente, se estableció un flujo continuo de PBST y se hizo fluir el anticuerpo oxidado sobre la superficie (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en tampón acetato 10 mM a pH 4.5. Se examinó la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en PBST (220 μL a 20 $\mu\text{L/min}$).

2.11.2. Inmovilización por captura

Para la biotilación con NHS-LC-Biotina, se tomaron alícuotas de 500 μL de 250 $\mu\text{g/mL}$ en PBS de los mAbs hGH-12 y hCG-21 y se les añadió el volumen necesario del reactivo NHS-LC-Biotina 10 mM en agua para alcanzar un exceso molar de 50, 25, 10 o 5 veces respecto al anticuerpo. Se dejó reaccionar durante 2 h. en hielo y posteriormente se dializó frente a PBS para eliminar el exceso de reactivo.

Para la biotilación con Biotina-LC-Hidracida se tomó una alícuota de 250 μL a 500 $\mu\text{g/mL}$ del mAb hGH-12 oxidado como se ha explicado anteriormente y se le añadieron 27 μL de una disolución 50 mM de Biotina-LC-Hidracida en DMSO, dejando la mezcla reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente con agitación suave y posteriormente se dializó frente a PBS para eliminar el exceso de reactivo.

Se comprobó la posibilidad de inmovilizar la estreptavidina usando el acoplamiento mediante sus grupos amino. Siguiendo el protocolo descrito anteriormente se prepararon diferentes superficies sensoras con SAMs mixtas de los

alcanotioles MHDA y MUOH en fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.02. Con la intención de encontrar el pH óptimo para la inmovilización, se prepararon disoluciones de estreptavidina con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ variando el pH dentro del rango de 3 a 8 y se hicieron fluir (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) sobre un sensor modificado con la SAM de $\chi_{\text{MHDA}}=1$ sin llevar a cabo la activación. Tras cada inyección de cada una de éstas disoluciones la superficie se regeneró con una disolución de NaOH 10 mM (30 μL a 30 $\mu\text{L/min}$). Una vez establecidas éstas condiciones se activó la superficie con EDC 0.2 M y NHS 0.05 M (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$), seguidamente se introdujo una disolución de 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina en tampón acetato 10 mM a pH 5 (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) y se bloqueó la superficie con 1 M de etanolamina a pH 8.5 (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$). A continuación se estableció un flujo constante de PBST y se inyectó el anticuerpo hGH-12 biotinilado a 10 $\mu\text{g/mL}$ en PBST (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$). Finalmente, se examinó la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en PBST (220 μL a 20 $\mu\text{L/min}$).

Por último, se llevó a cabo la inmovilización de estreptavidina mediante la unión previa de Biotina-LC-Hidracida sobre diferentes superficies sensoras con las SAMs mixtas ya descritas de $\chi_{\text{MHDA}}= 1, 0.2, 0.1, 0.05, 0.033, 0.02, 0.013$ y 0.01. Para ello, se activaron los grupos carboxilos de la SAM con EDC 0.2 M y NHS 0.05 M (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$), inmediatamente se introdujo una disolución de Biotina-LC-Hidrazida 5 mM en tampón acetato 10 mM a pH 4.5 y se bloqueó la superficie con 1 M de etanolamina a pH 8.5 (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$). A continuación se estableció un flujo constante de PBST y se inyectaron 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina en PBST (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) y seguidamente 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo hGH-12 biotinilado en PBST (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$). Finalmente, se examinó la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en PBST (220 μL a 20 $\mu\text{L/min}$).

Se realizaron varios experimentos para estudiar el efecto de la cantidad de reactivo de biotinilación NHS-LC-Biotina. Para este propósito se usaron superficies sensoras con una SAM mixta de MHDA/MUOH con una $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ sobre las que se formó una capa de biotina y seguidamente otra de estreptavidina, como se ha explicado en el párrafo anterior. Posteriormente, en cada una de estas superficies se inyectaron (220 μL a 10 $\mu\text{L/min}$) disoluciones de 10 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo hGH-12 en PBST

biotinilado con un exceso molar de reactivo de biotinilación de 50, 25, 10 o 5. Finalmente, se examinó la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 µg/mL de hGH en PBST (220 µL a 20 µL/min).

También se comprobó el funcionamiento del anticuerpo biotinilado mediante Biotina-LC-Hidrazida. Se usó una superficie sensora con una SAM mixta de MHDA/MUOH con una $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ sobre las que se formó una capa de biotina y seguidamente otra de estreptavidina, siguiendo el protocolo anterior. Posteriormente, se inyectó (220 µL a 10 µL/min) una disolución de 10 µg/mL del anticuerpo hGH-12 en PBST biotinilado con Biotina-LC-Hidrazida. Finalmente, se examinó la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado mediante la inyección de 1 µg/mL de hGH en PBST (220 µL a 20 µL/min).

Por último, se utilizó un sensor con una SAM mixta de MHDA/MUOH con una $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$, se funcionalizó con biotina y estreptavidina en las mismas condiciones anteriores y se inyectaron (220 µL a 10 µL/min) 10 µg/mL del anticuerpo hCG-21 biotinilado (relación molar anticuerpo/biotina de 1/50) en PBST. Una vez formada esta capa de anticuerpo se inyectaron disoluciones de hFSH y hLH a concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 1000 ng/mL, respectivamente. La regeneración de la superficie tras cada medida se alcanzó con una inyección de HCl 5 mM (30 µL a 30 µL/min).

2.12. Referencias

1. Harlow, E. and D. Lane, *Antibodies : a laboratory manual*. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. XIII, 726 p.
2. Mauriz, E., *Desarrollo de un biosensor óptico como nueva herramienta analítica para la determinación de pesticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos.*, in *Departamento de Ecología, Genética y Microbiología*. 2006, Universidad de León: León.
3. Mellado, M., et al., *Characterization of monoclonal antibodies specific for the human growth hormone 22K and 20K isoforms*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1996. **81**(4): p. 1613-1618.

3. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hGH en muestras de suero

3.1. Inmovilización de la hGH

Para llevar a cabo la determinación de la hGH se eligió un formato de inmunoensayo de inhibición con el antígeno inmovilizado en la superficie con la intención de alargar el tiempo de vida útil del dispositivo. Las superficies funcionalizadas con anticuerpos presentan bajos rendimientos [1] debido a que su funcionamiento puede alterarse con la inmovilización, debido a la falta de orientación o a la sensibilidad a las condiciones de regeneración empleadas en este tipo de ensayos. El formato de inmunoensayo de inhibición permite llevar a cabo una medida directa sin necesidad de especies secundarias o marcadores. Este formato asegura la reutilización y

la estabilidad del dispositivo, manteniendo su actividad intacta a lo largo de un elevado número de ciclos de medida y regeneración.

La inmovilización consiste en la formación de una capa monomolecular del elemento de reconocimiento biológico de forma estable y controlada. Como ya se ha explicado en la introducción, las SAMs proporcionan un excelente método para este propósito, debido a la simplicidad y fiabilidad del proceso de formación, a la reproducibilidad de la superficie con la regeneración y a la flexibilidad para la incorporación de diferentes biomoléculas. La inmovilización del receptor biológico se llevó a cabo, mediante la formación de una SAM de MUA, terminada en grupos carboxilo, sobre la que posteriormente se unió covalentemente la hormona mediante acoplamiento amino utilizando la química del EDC y el NHS. El mecanismo de reacción (Fig. 3.1) de los grupos carboxilo de la SAM con el EDC implica la formación de un intermedio O-acilisourea, que posteriormente da lugar a un éster activo de NHS, y la sustitución nucleofílica con un grupo amino, generalmente con los grupos ϵ -amino de las lisinas de las proteínas [2].

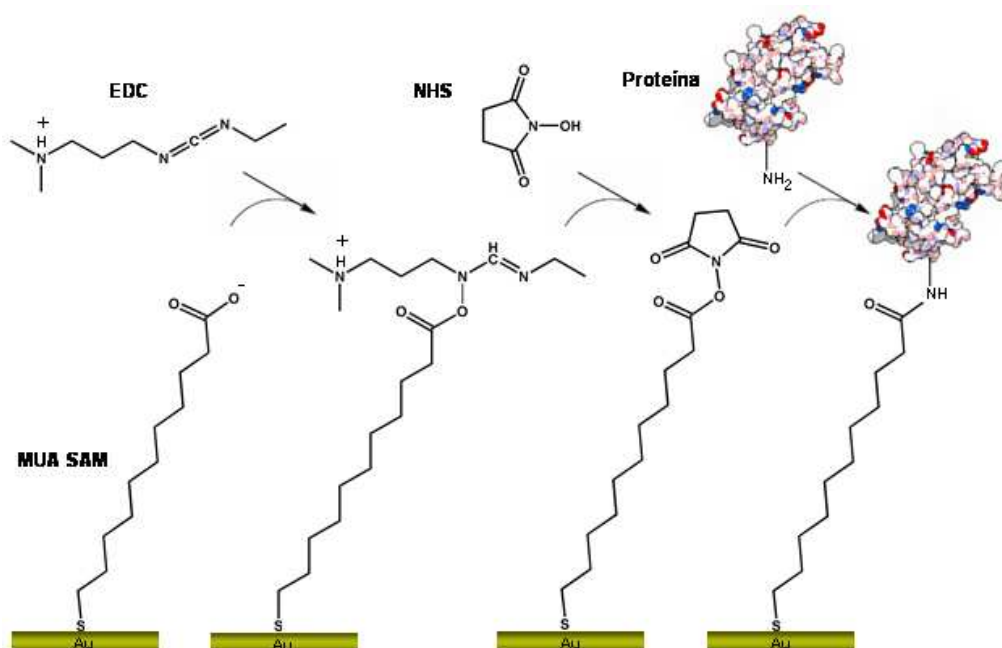


Figura 3.1. Representación esquemática del mecanismo de reacción del acoplamiento amino de una proteína en una SAM terminada en grupos carboxilo

La activación de la superficie con EDC y NHS se ve favorecida a pH superiores al pKa de la SAM (en el caso de la SAM de MUA es de alrededor de 6.5 [3, 4]) ya que en esas condiciones hay una mayor proporción de grupos carboxilos deprotonados. La posterior incorporación de la proteína se ve favorecida a pHs por debajo de su punto isoeléctrico (pI), ya que de esta manera se encuentra cargada positivamente y se produce una atracción con la superficie [5]. Ésta interacción electrostática se ve favorecida también en condiciones de fuerza iónica reducida. Debido a estos requerimientos, la inmovilización de proteínas mediante éste tipo de acoplamiento se lleva a cabo generalmente en disoluciones tampón 10 mM con pH en el rango de 4 a 6 [5].

El primer paso a la hora de encontrar las condiciones óptimas para la inmovilización es la elección del pH de inmovilización. Las señales obtenidas al inyectar diferentes disoluciones de hGH a 10 µg/mL en pH comprendidos entre 3.5 y 7.5 en el sensor modificado con la SAM de MUA sin activar se muestran en la Figura 3.2.

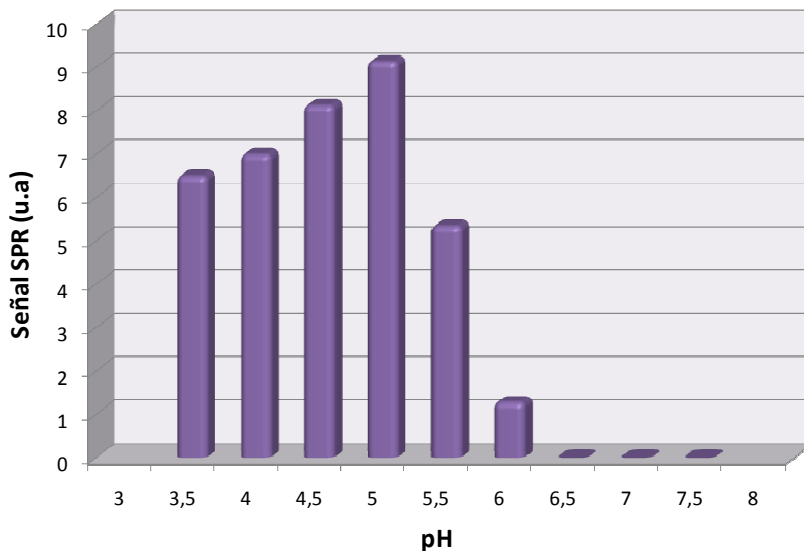


Figura 3.2. Representación de las señales de SPR producidas por la adsorción de hGH sobre la superficie de la SAM sin activar utilizando disoluciones de diferentes pHs

Los resultados obtenidos son coherentes con el mecanismo explicado anteriormente. Cuando la hGH se inyecta en tampones de pH superior a su punto isoelectrico (5-5.5), al encontrarse cargada negativamente, se produce una repulsión con la superficie que evita que se adsorba sobre ella. Sin embargo, cuando se encuentra a pHs por debajo de su punto isoelectrico, se encuentra cargada positivamente, por lo que se ve atraída por la superficie y se adsorbe en mayor medida. Según vamos disminuyendo el pH, va disminuyendo también la proporción de grupos carboxilos deprotonados en la superficie, por lo que este efecto de atracción de cargas va reduciéndose. El efecto global origina que la proteína se adsorba más en la superficie a un pH ligeramente inferior al punto isoelectrico. En consecuencia, se eligió un tampón 10 mM de acetato a pH 5 para la inmovilización de la hGH durante el resto del trabajo.

La concentración de la proteína para la inmovilización es otro parámetro de gran importancia y suele situarse entre 10-100 $\mu\text{g/mL}$, dependiendo de la eficiencia de la reacción, la naturaleza de la proteína y las necesidades de la aplicación. En el caso de ensayos como el que se trata en éste trabajo, para la determinación de la concentración de un analito, es deseable alcanzar el nivel de inmovilización máxima que proporcione una sensibilidad adecuada. Debido a esto es importante disponer de una proteína con la mayor pureza posible para la inmovilización. Se prepararon superficies inmovilizadas con varias concentraciones de hGH y se comprobó su funcionamiento respecto a la unión del anticuerpo específico hGH-12. Todos los anticuerpos utilizados en este trabajo han sido purificados mediante precipitación en sulfato amónico, pero el anticuerpo hGH-12 ha sido purificado adicionalmente mediante una columna de afinidad de hGH.

En la Figura 3.3 se representan las señales SPR producidas al inyectar concentraciones de anticuerpo hGH-12 de 0.5, 1, 2, 2.5 y 5 $\mu\text{g/mL}$ en superficies inmovilizadas con 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de hGH. Aunque el dispositivo permite detectar concentraciones de anticuerpo hGH-12 por debajo de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, las señales son débiles, por lo que se eligió una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ como concentración mínima de partida. Se fue aumentando gradualmente la concentración de anticuerpo hGH-12 hasta una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, a partir de la cual las superficies comienzan a saturarse y se pierde la linealidad. Puede observarse que la capacidad de

unión del anticuerpo aumenta con la concentración inmovilizada, aunque este efecto es menor a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, la señal SPR producida por las concentraciones de anticuerpo hGH-12 con las que trabajamos habitualmente ($< 2 \mu\text{g/mL}$) es muy similar en todas las superficies. En función de estos resultados se fijó una concentración de inmovilización de 50 $\mu\text{g/mL}$ de hGH para el resto del trabajo.

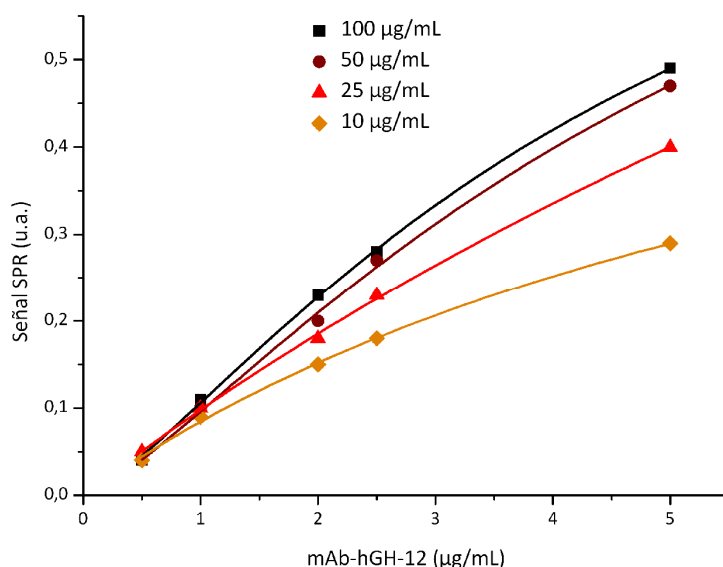


Figura 3.3. Señales SPR producidas para varias concentraciones de anticuerpo hGH-12 en superficies inmovilizadas con diferentes concentraciones de hGH

En la Figura 3.4 se presenta un sensograma en tiempo real de la inmovilización de la hGH en las dos celdas de flujo del equipo simultáneamente. En primer lugar se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó la disolución de hGH, produciéndose un incremento en la señal de SPR debida a su inmovilización. Mediante una disolución de HCl 100 mM nos aseguramos de que todas las moléculas que permanecen en la superficie están unidas covalentemente, desprendiendo todas las moléculas que se pudieran encontrar adsorbidas físicamente. Una segunda inyección de hGH produce una señal de SPR más reducida que la primera, debido a que quedan menos sitios de unión disponibles. Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina. El incremento de señal de SPR respecto al

inicio de la inmovilización nos da una idea de la cantidad de hGH inmovilizada, aunque es la señal producida por la unión del anticuerpo específico la que nos proporciona información de la funcionalidad de la capa formada.

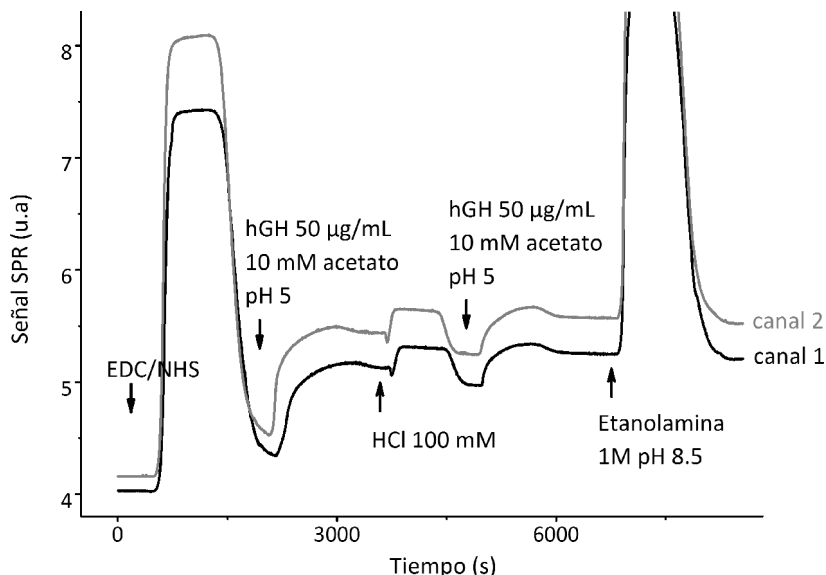


Figura 3.4. Sensograma del proceso de inmovilización de la hGH en las dos celdas de flujo del sensor SPR

3.2. Inmunoensayo de SPR para la determinación de hGH en PBST

Los experimentos se llevaron a cabo en un formato de inmunoensayo de inhibición, explicado anteriormente en la introducción, que consiste en la adición de una cantidad constante de anticuerpo a todas las muestras. La posterior unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado es inhibida por la presencia del analito, lo que produce la disminución de la señal de SPR a medida que la concentración del analito aumenta. En la Figura 3.5 podemos observar las señales de SPR producidas por disoluciones con una concentración constante de anticuerpo hGH-12 y concentraciones crecientes de hGH. Al final de cada ciclo de medida se disocia la unión mediante la inyección de una disolución de regeneración, lo que queda demostrado por la

disminución de la señal de SPR exactamente hasta el mismo nivel anterior a la asociación, quedando preparada la superficie para el siguiente ciclo.

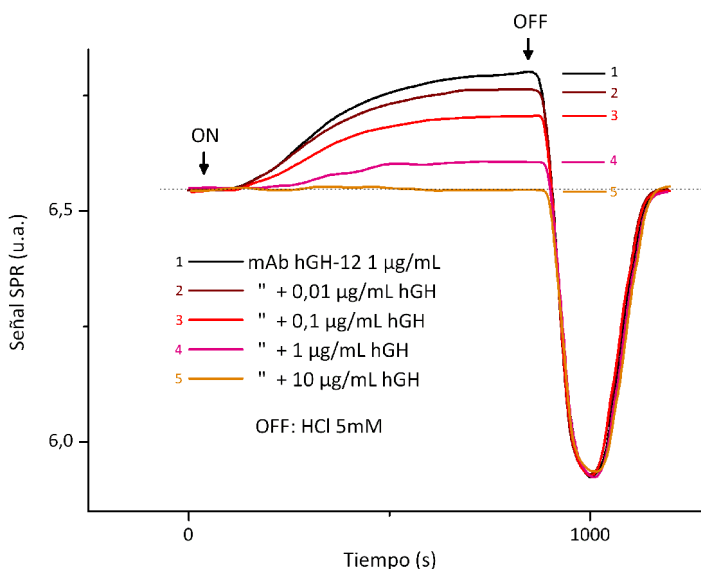


Figura 3.5. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por una concentración constante de anticuerpo hGH-12 para diferentes concentraciones de hGH.

La sensibilidad de éste tipo de ensayos está influenciada por la afinidad y por la concentración de anticuerpo utilizado [6], ya que cantidades de anticuerpo más pequeñas son saturadas por cantidades más bajas de antígeno. De esta manera, la optimización de las condiciones del inmunoensayo requiere encontrar un compromiso entre la utilización de una cantidad pequeña de anticuerpo, que produce una mejor sensibilidad del ensayo, pero lo suficientemente grande para generar una señal SPR que se pueda cuantificar con precisión.

La Figura 3.6 muestra las curvas de calibrado resultantes de la medida por triplicado de disoluciones estándar de hGH en el intervalo de concentración 10^{-4} - 100 µg/mL en PBST obtenidas utilizando concentraciones del anticuerpo de 0.25, 0.5, 1 y 2 µg/mL. Puede observarse como las curvas se desplazan a niveles de concentración más bajos al disminuir la concentración de anticuerpo, mejorando la sensibilidad del ensayo de acuerdo con la explicación anterior. En consecuencia, se eligió una concentración de 0.25 µg/mL de anticuerpo hGH-12 como la concentración adecuada para la realización

del ensayo, ya que concentraciones más bajas producen señales demasiado débiles para mantener la precisión del ensayo.

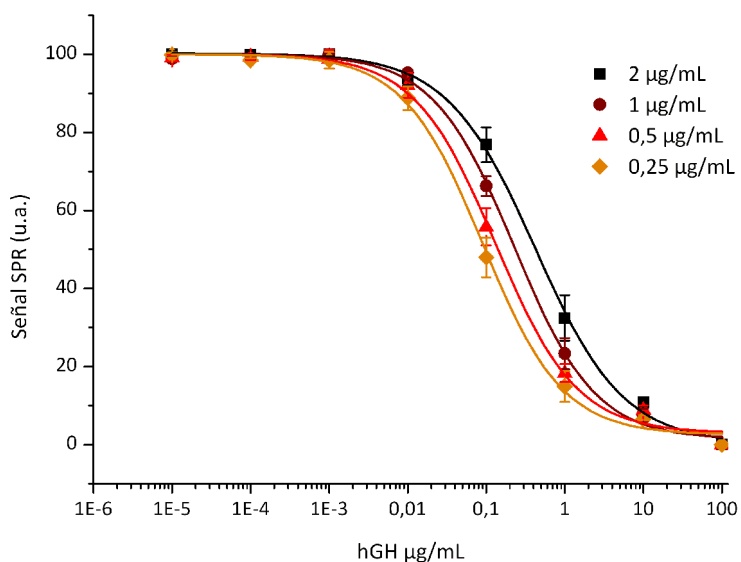


Figura 3.6. Curvas de calibrado para la determinación de hGH llevadas a cabo con varias concentraciones de anticuerpo.

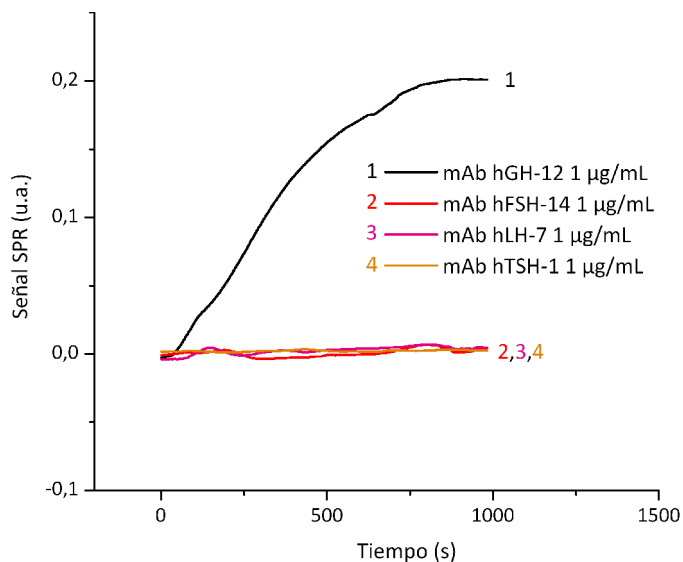


Figura 3.7. Sensogramas correspondientes a las señales de SPR producidas por el anticuerpo específico hGH-12 y los anticuerpos inespecíficos en el sensor de hGH

Aunque todos los anticuerpos utilizados en este trabajo han sido caracterizados previamente mediante RIA y EIA, se llevaron a cabo comprobaciones adicionales en este nuevo formato de inmunoensayo SPR. Se comprobó la especificidad del sensor por su anticuerpo correspondiente en comparación con anticuerpos monoclonales específicos del resto de las hormonas pituitarias. Para ello se fluyeron disoluciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de estos anticuerpos en el sensor de hGH utilizando las mismas condiciones experimentales. La especificidad de la respuesta del sensor de hGH quedó demostrada, tal como se muestra en la Figura 3.7, por la inapreciable señal de SPR producida por la inyección de disoluciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de los anticuerpos hTSH-1, hFSH-14 y hLH-7, respectivamente.

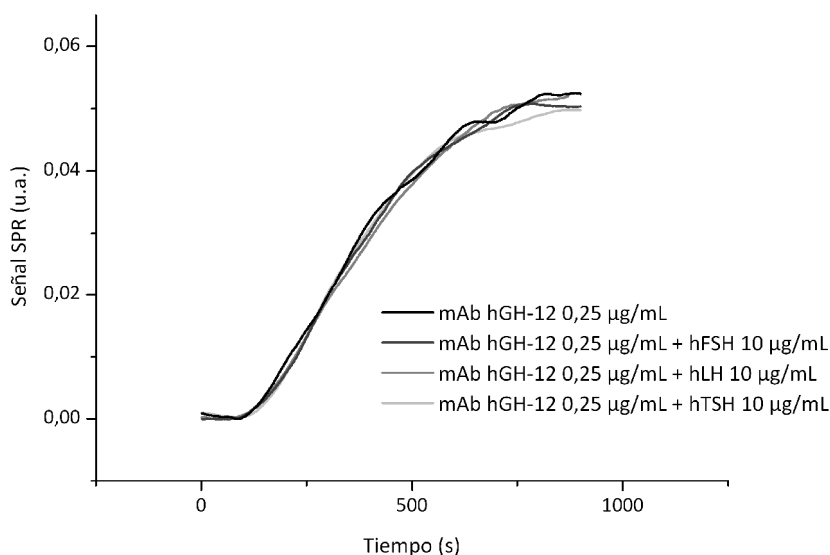


Figura 3.8. Sensogramas correspondientes a las señales de SPR producidas por el anticuerpo específico hGH-12 en presencia de las demás hormonas pituitarias

La reactividad cruzada del anticuerpo hGH-12 con las hormonas pituitarias hTSH, hFSH y hLH se comprobó también inyectando en el sistema mezclas del anticuerpo específico hGH-12 a 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y los analitos inespecíficos hTSH, hFSH o hLH a 10 $\mu\text{g/mL}$. La presencia de estas hormonas no produjo inhibición apreciable en la señal SPR debida al anticuerpo, tal como puede observarse en la Figura 3.8. La nula influencia de la presencia de éstos analitos sobre la señal producida por la interacción

específica demostró que el anticuerpo es suficientemente selectivo para no reconocer el resto de analitos presentes en la disolución, lo que puede permitir llevar a cabo la detección de estas sustancias en muestras complejas que contengan más de una de estas hormonas.

En la Figura 3.9. se muestra la curva de calibrado y las características analíticas del inmunoensayo de inhibición para la determinación de hGH en tampón PBST. El límite de detección (LOD), se determinó como la cantidad de analito que inhibe la señal de SPR máxima en una cantidad igual a 3 veces la desviación estándar de las muestras blanco. El rango lineal comprende las concentraciones que producen una inhibición del 20% al 80% de la señal SPR máxima y el I_{50} es la concentración que produce una inhibición del 50% de la señal de SPR máxima.

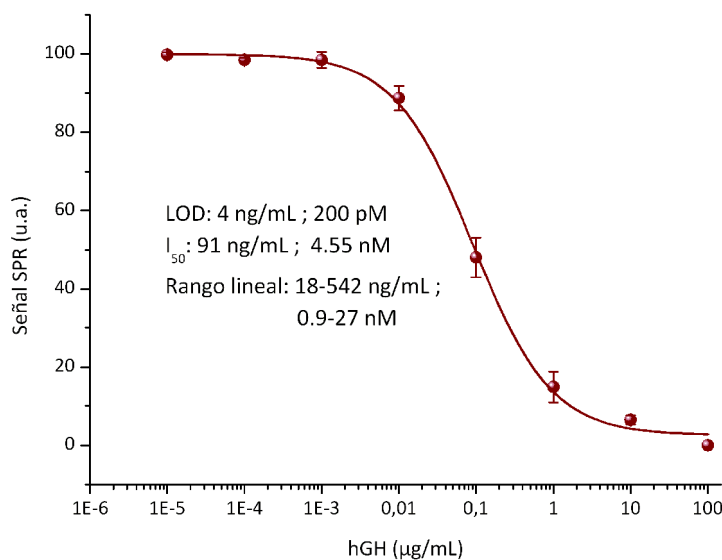


Figura 3.9. Curvas de calibrado y características analíticas del inmunoensayo de SPR para la determinación de hGH en PBST

El ensayo presenta un LOD de 4 ng/mL, equivalente a 200 pM, que constituye una sensibilidad adecuada para el diagnóstico de desórdenes en la secreción de hGH. El I_{50} del ensayo tiene un valor de 91 ng/mL, equivalente a 4.55 nM, y el rango se extiende hasta 542 ng/mL, equivalente a 27 nM, por lo que permite determinar también las concentraciones fisiológicas más elevadas. El análisis se lleva a cabo de forma sencilla

y rápida, la determinación de dos muestras simultáneamente incluyendo la regeneración realiza en 20 minutos. Una vez establecidos los parámetros del proceso de inmovilización y del inmunoensayo en disolución tampón, se pasó a investigar las condiciones necesarias para poder llevar a cabo la determinación de hGH en muestras de suero.

3.3. Optimización de las condiciones de trabajo con muestras de suero

El suero sanguíneo es una matriz de análisis muy valiosa clínicamente, ya que contiene miles de proteínas que proporcionan una amplia información, especialmente para la detección de biomarcadores de diferentes enfermedades. Pero unido al interés por su elevado contenido en proteínas se encuentra la problemática asociada a su complejidad analítica. El 90% de su contenido en proteínas (60-80 mg/mL) está compuesto por unas pocas proteínas de gran abundancia pero de poco interés clínico que enmascaran el resto de las proteínas en las técnicas proteómicas. La separación de estas proteínas es posible, pero es compleja, lenta, cara y las proteínas y péptidos de interés son generalmente transportadas por la albúmina, perdiéndose una valiosa información [7, 8].

El desarrollo de biosensores ópticos para aplicaciones clínicas reales se ha visto obstaculizado por los efectos de la matriz causados por las especies presentes en las complejas muestras utilizadas. Las aplicaciones de biosensores SPR en suero son poco comunes y generalmente hacen uso de elaborados procesos de pretratamiento o bien sólo pueden determinar analitos en altas concentraciones mediante un elevado grado de dilución de las muestras. El objetivo de éste trabajo fue demostrar la determinación de un analito clínico en suero de forma directa, sin dilución ni ningún tipo de tratamiento previo de la muestra. Para este propósito se empleó el inmunoensayo de hGH como modelo, ya que los niveles de sensibilidad alcanzados podrían proporcionar un valioso campo de aplicación para el diagnóstico de la deficiencia de hGH.

Los componentes del suero pueden afectar al inmunoensayo debido a su adsorción sobre la superficie sensora, produciendo de esta manera una respuesta

inespecífica que enmascara la interacción y evita la adecuada regeneración, lo que reduce la vida útil del dispositivo. Además, estas especies podrían interferir la unión del anticuerpo con el antígeno inmovilizado de forma que la señal se viera reducida. En el formato de inmunoensayo de inhibición, los componentes del suero podrían adicionalmente afectar a la interacción entre el antígeno y el anticuerpo en la mezcla de preincubación, produciendo así una reducción de la sensibilidad del ensayo y un enmascaramiento de la concentración real.

Estos efectos de matriz son un reto no solo para los biosensores de SPR sino también para casi cualquier tipo de dispositivo biosensor, de manera que se han propuesto diferentes estrategias para reducir su impacto. Como ya se ha comentado en el punto 1.6.2, entre estas estrategias destacan el desarrollo de recubrimientos superficiales que presenten alta resistencia a la adsorción de proteínas y la búsqueda de las condiciones del tampón del ensayo que permitan reducir la unión inespecífica de los componentes de la matriz.

Se examinó el efecto de varios componentes del tampón de ensayo en la reducción de la unión inespecífica de proteínas y el funcionamiento del inmunoensayo. En primer lugar se comprobó la contribución a ésta reducción del pH, la fuerza iónica y la concentración del surfactante Tween 20. El pH se modificó del pH de 7.4 del PBST inicial hasta 6.5 y 8, valores cercanos a los extremos del intervalo de funcionamiento de éste tampón. La fuerza iónica se incrementó mediante el aumento de la concentración de NaCl desde los 137 mM del PBST inicial a 500 mM. En cuanto al surfactante Tween 20, su concentración se duplicó del 0.05% inicial al 0.10%. Se prepararon 12 tampones variando simultáneamente los tres factores descritos.

La Figura 3.10 muestra las señales SPR producidas por la unión inespecífica de los componentes del suero al inyectar varias alícuotas de suero de conejo mezcladas (1:1) con los diferentes tampones en el sensor funcionalizado con hGH. El tampón PBST de partida es el que se muestra en el gráfico como nº 5.

En la Figura 3.11 se muestran algunos sensogramas correspondientes a las muestras de suero introducidas en los tampones que producen reducciones más significativas de la unión inespecífica. Las señales de SPR producidas consisten en un aumento brusco debido a la contribución del índice de refracción del suero junto con la

señal debida a la interacción inespecífica de los componentes del suero con la superficie. Una vez que la muestra ha terminado de atravesar la celda, se produce una reducción brusca de la señal al volver a llenarse con el tampón del ensayo y seguidamente, el flujo de tampón va desprendiendo las moléculas unidas inespecíficamente, por lo que la señal va disminuyendo de forma continua hasta que se alcanza una señal estable.

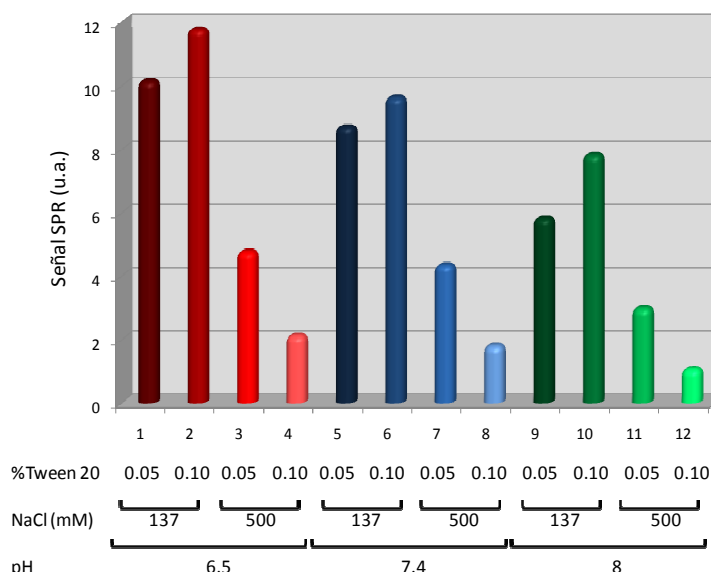


Figura 3.10. Señales de SPR producidas por el suero utilizando diferentes tampones de ensayo.

La variación del pH del tampón a pH 8 hace disminuir un 33% la señal producida por la unión inespecífica mientras que su disminución a pH 6.5 agrava el efecto en un 14%, como se muestra en la Figura 3.12. La explicación de éste comportamiento podría deberse a la naturaleza electrostática de la interacción entre las proteínas presentes en el suero y la superficie. Cuando trabajamos a pH 8, superior al pI de la mayoría de las proteínas, éstas se van a encontrar cargadas negativamente, por lo que podrían verse repelidas por las moléculas de hGH (pI: 5 – 5,5) inmovilizadas en la superficie del sensor, las cuales también se encontraran cargadas negativamente a éste pH. Utilizando tampones de pH 6.5 y 7.4, la hGH inmovilizada en la superficie continuará cargada negativamente, pero la fracción de proteínas del suero con pI más

elevado estarán cargadas positivamente, por lo que se podrían ver atraídas en mayor medida sobre la superficie.

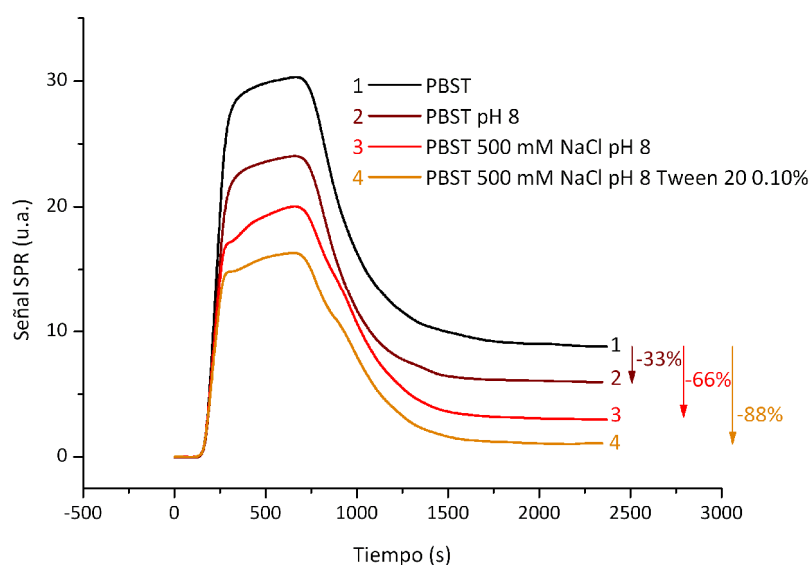


Figura 3.11. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero utilizando diferentes tampones de ensayo. Se muestra la reducción en la unión inespecífica producida en cada caso.

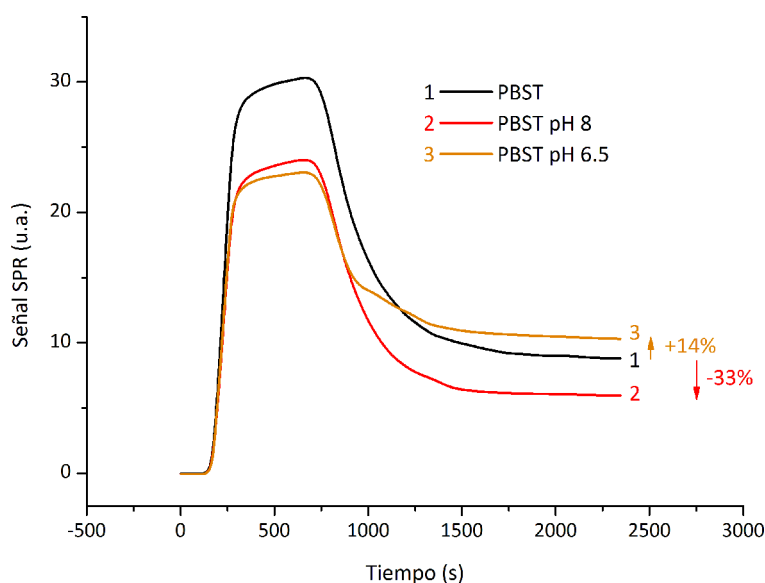


Figura 3.12. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero utilizando diferentes tampones de ensayo. Se muestra la reducción en la unión inespecífica producida en cada caso.

En cuanto a la elevación de la fuerza iónica mediante la adición de NaCl hasta una concentración de 500 mM, como podemos observar en la Figura 3.13, reduce un 50% la señal debida a la unión inespecífica. La presencia de una elevada fuerza iónica podría apantallar la interacción electrostática entre las proteínas del suero y la superficie, lo que podría ser la causa de la drástica disminución de la señal de SPR. La combinación de un pH elevado con una elevada fuerza iónica produce una disminución del 66% de la señal producida por la unión inespecífica. Aunque el resultado de la unión de estos dos factores produce una reducción mayor, el efecto no es aditivo, lo que puede deberse a que el apantallamiento de cargas producido por la elevada fuerza iónica atenúe la repulsión electrostática generada por el pH elevado.

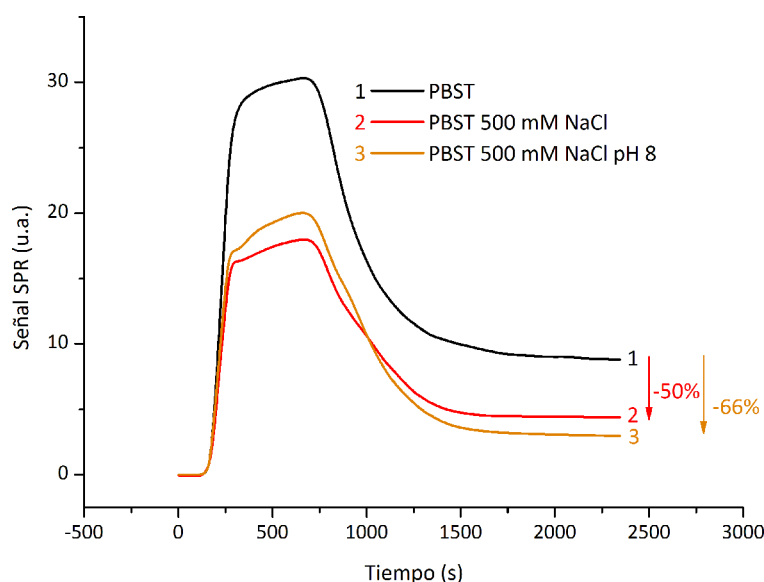


Figura 3.13. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero utilizando diferentes tampones de ensayo. Se muestra la reducción en la unión inespecífica producida en cada caso.

El aumento de la concentración de Tween 20 del 0.05% al 0.1% produce un aumento de la unión inespecífica de las proteínas, contrariamente a lo esperado, como muestra la Figura 3.14. Sin embargo, cuando el incremento de la concentración de Tween 20 se lleva a cabo en presencia de una fuerza iónica elevada, produce una reducción de la unión inespecífica de un 79%.

La unión inespecífica más reducida se consiguió con un tampón PBST con 500 mM NaCl, Tween 20 al 0.1% y pH 8, al que a partir de ahora nos referiremos como PBST-S. El uso de estas condiciones produce una reducción del 88% en la unión inespecífica de los componentes del suero. De ésta manera demostramos como la elección de un tampón adecuado puede tener un efecto drástico en la reducción de la unión inespecífica, la cual constituye uno de los problemas centrales en el desarrollo de biosensores SPR. Además, se comprobó el funcionamiento del anticuerpo hGH-12 en las condiciones proporcionadas por el tampón PBST-S mediante la comparación entre las señales SPR producidas por disoluciones de hGH-12 a 1 $\mu\text{g/mL}$ en PBST y en PBST-S, de la que se obtuvo como resultado que la interacción se mantiene, aunque la señal de SPR se ve reducida un 10%.

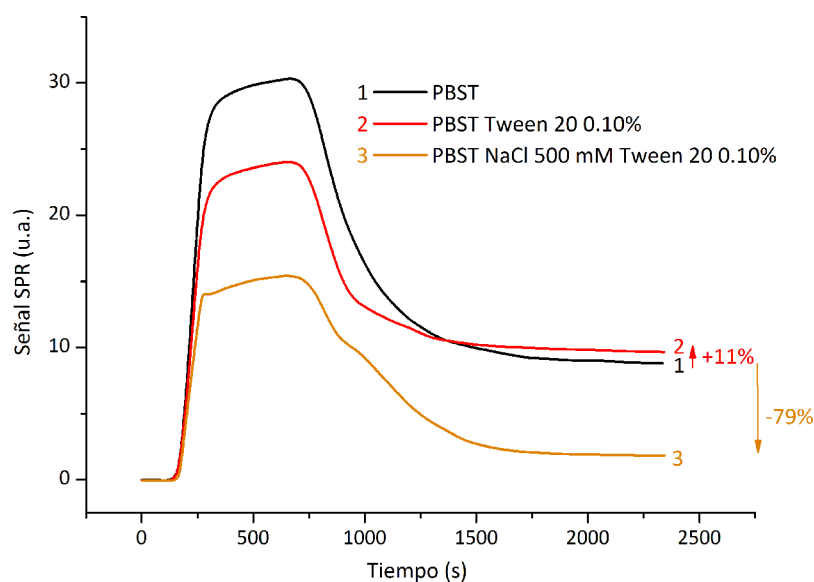


Figura 3.14. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero utilizando diferentes tampones de ensayo. Se muestra la reducción en la unión inespecífica producida en cada caso.

También se comprobó el efecto del nivel de inmovilización de la hGH sobre la unión inespecífica. Se prepararon diferentes superficies utilizando concentraciones de inmovilización de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de hGH, respectivamente. Seguidamente se inyectaron muestras de suero mezcladas (1:1) con el tampón PBST-S (Fig.3.15). Mientras que el aumento de la concentración de inmovilización a 100 $\mu\text{g/mL}$ no

produjo un efecto apreciable en la señal SPR debida a la unión inespecífica, al reducir la concentración de inmovilización a 25 y 10 $\mu\text{g/mL}$ se produjo un aumento de la señal de SPR debida a la unión inespecífica, en un 17% y un 30%, respectivamente. Al no obtener ninguna mejora sustancial se mantuvo la concentración de inmovilización de 50 $\mu\text{g/mL}$ elegida anteriormente.

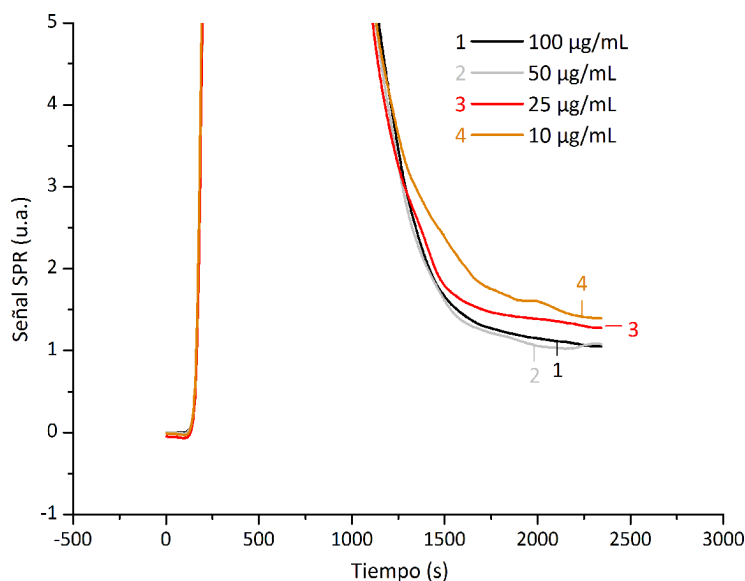


Figura 3.15. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero utilizando superficies con diferentes concentraciones de hGH inmovilizada.

La unión inespecífica también puede reducirse mediante la utilización de SAM mixtas compuestas por alcanotioles funcionalizados para la inmovilización del biorreceptor junto con alcanotioles de cadena ligeramente más corta que proporcionen un entorno que produzca una menor interacción electrostática con los componentes del suero. Para estudiar éste efecto, se emplearon diferentes superficies en las que se formaron SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH en fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1 y 0.05. En éstas SAMs se inmovilizó la hGH en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. En la Figura 3.16 se muestran las señales de SPR producidas por el anticuerpo hGH-12 a 2 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S mezclado (1:1) con suero y por el suero mezclado (1:1) únicamente con PBST-S, utilizando sensores funcionalizados con diferentes proporciones de las SAMs mixtas. La reducción de la

unión inespecífica que se observa al aumentar la proporción de MUOH no es muy marcada y además produce una reducción paralela de la señal específica del anticuerpo. Debido a esto se mantuvo la SAM formada exclusivamente por MUA utilizada inicialmente, ya que es la que consigue la mejor relación entre la señal específica y la unión inespecífica.

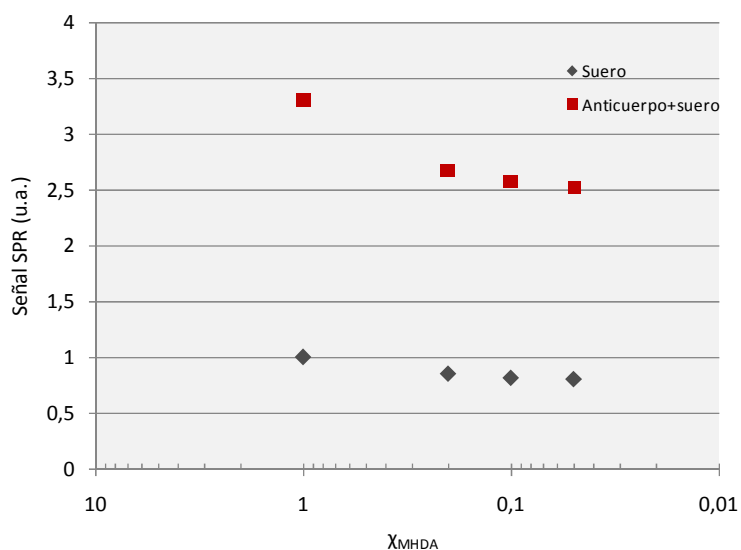


Figura 3.16. Señales de SPR producidas por la señal específica del anticuerpo en suero y la inespecífica debida al suero utilizando varios sensores con SAMs mixtas de diferente proporción

También se comprobó la utilidad del aditivo CM-Dextrano para reducir la unión inespecífica, como se ha propuesto en algunos trabajos [9-11]. La adición al tampón del ensayo de concentraciones de CM-Dextrano a 1, 2 y 10 mg/mL no produce una reducción apreciable de la señal SPR debida a la unión inespecífica de los componentes del suero, por lo que se descartó su uso. Aunque se ha descrito que este aditivo puede reducir la unión inespecífica, existe la posibilidad de que éste efecto no tenga lugar en las condiciones establecidas por el tampón del ensayo PBST-S.

Aunque hay que tener en cuenta que la reducción de la unión inespecífica de los componentes de la matriz que se ha conseguido es muy eficaz, aun se mantiene una adsorción inespecífica residual que va a generar una señal SPR de fondo en todas las medidas en suero. Sin embargo, si se consigue obtener una señal específica

notablemente mayor que la señal de fondo, se podrá cuantificar adecuadamente el analito. Para este propósito se midieron las señales de SPR producidas por mezclas (1:1) de suero con diferentes concentraciones de anticuerpo en PBST-S (Fig 3.17).

La señal de SPR inespecífica residual producida por el suero supone el 82% de la señal correspondiente a la mezcla con 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de mAb hGH-12, el 71% de la de 0.5 $\mu\text{g/mL}$, el 48% de la de 1 $\mu\text{g/mL}$ y el 30% de la mezcla con 2 $\mu\text{g/mL}$. La presencia de una señal de fondo del 30% permite cuantificar con precisión la inhibición de la señal del anticuerpo producida por la presencia de la hGH en el suero. Además, de acuerdo con los resultados para el ensayo en tampón PBST, mostrados en la Figura 3.6, aunque la sensibilidad del ensayo disminuye al aumentar la concentración del anticuerpo, utilizando una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ se obtiene un límite de detección de 10 ng/mL y un I_{50} de 420 ng/mL. Si el inmunoensayo de inhibición en suero no se desvía de este comportamiento, la determinación de hGH puede llevarse a cabo en niveles de concentración adecuados para la determinación de insuficiencia de hGH en muestras clínicas.

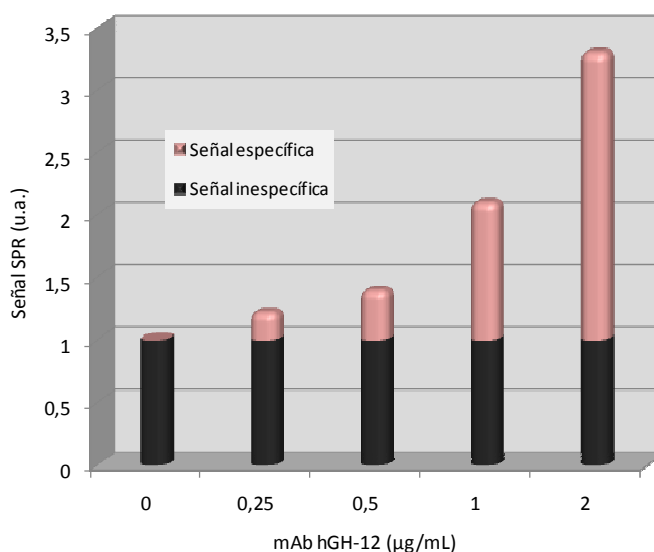


Figura 3.17. Señales de SPR producidas por varias concentraciones de anticuerpo hGH-12 en suero.

La dificultad para conseguir la completa regeneración de la superficie tras cada ciclo de medida, permitiendo así una adecuada reutilización del dispositivo, es otro

problema que surge al llevar a cabo éste tipo de medidas en matrices tan complejas como el suero. En este caso, la regeneración implica, además de interrumpir la unión entre el antígeno y el anticuerpo, la desorción de los componentes del suero unidos inespecíficamente. En los experimentos iniciales con muestras de suero se comprobó que la unión de los componentes del suero con la superficie del sensor era muy elevada y resultaba difícil de romper, por lo que la regeneración no se consiguió en las mismas condiciones utilizadas en las muestras en tampón PBST.

Inicialmente se comprobó la posibilidad de conseguir la regeneración completa utilizando disoluciones ácidas o básicas. Se inyectaron muestras de suero mezcladas (1:1) con el tampón PBST-S y se probaron diferentes disoluciones de regeneración, como muestra las Figura 3.18. La utilización de disoluciones de HCl 5 y 10 mM no consiguió romper en ninguna medida ésta unión, y era necesario llegar a concentraciones de HCl 100 mM para romperla en un 48%. Por otra parte, utilizando disoluciones básicas de NaOH 5 y 10 mM tampoco se lograba ningún efecto. Aumentando la concentración de NaOH hasta 100 mM se lograba una regeneración completa de la superficie, pero constituyen unas condiciones demasiado agresivas que reducían drásticamente la vida útil del dispositivo.

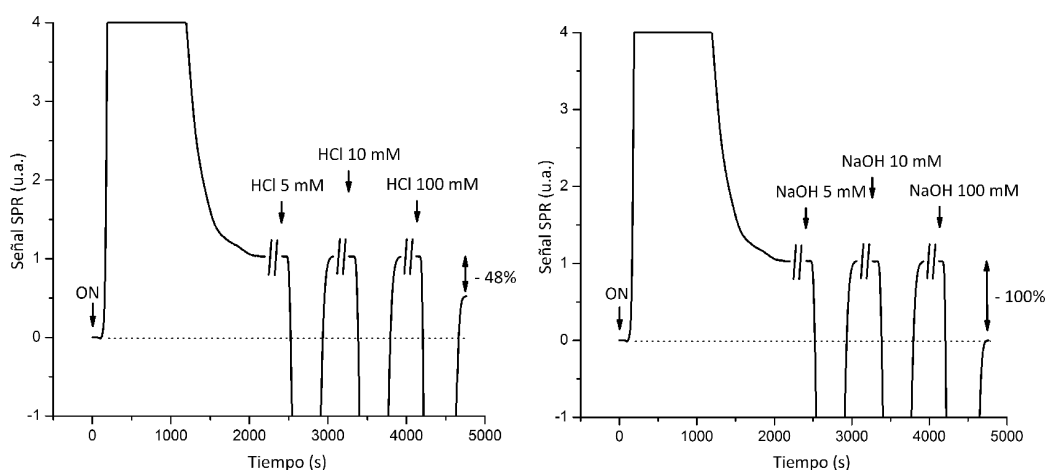


Figura 3.18. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero y los posteriores ciclos con diferentes disoluciones de regeneración.

Como ya se ha comentado en el punto 1.5.3, para interacciones de difícil ruptura, puede usarse disoluciones que combinen diferentes agentes de regeneración. El objetivo es conseguir romper la fuerte interacción inespecífica establecida entre los componentes del suero y la superficie pero mediante condiciones más suaves, que permitan alargar la vida útil de la superficie del sensor. Se inyectaron muestras de suero mezcladas (1:1) con el tampón PBST-S y se probaron diferentes mezclas de regeneración. Se utilizaron disoluciones de pH ácido de 2, 2.3 y 3 y pH básico, de 11, 11.7 y 12. El mejor funcionamiento lo demostraron las disoluciones de pH básico. Se combinaron los pHs de 11, 11.7 y 12 con concentraciones de NaCl de 0.5, 1 y 2 M para elevar la fuerza iónica. Utilizando la disolución de NaCl 2M a pH 12 se logró la ruptura al 100% de la unión. Se introdujo entonces un nuevo ingrediente, el surfactante Tween 20, en concentraciones de 0.05% y 0.10%. La utilización de Tween 20 al 0.10% permite regenerar la superficie al 100% junto con NaCl 2M y un pH 11, ligeramente más suave.

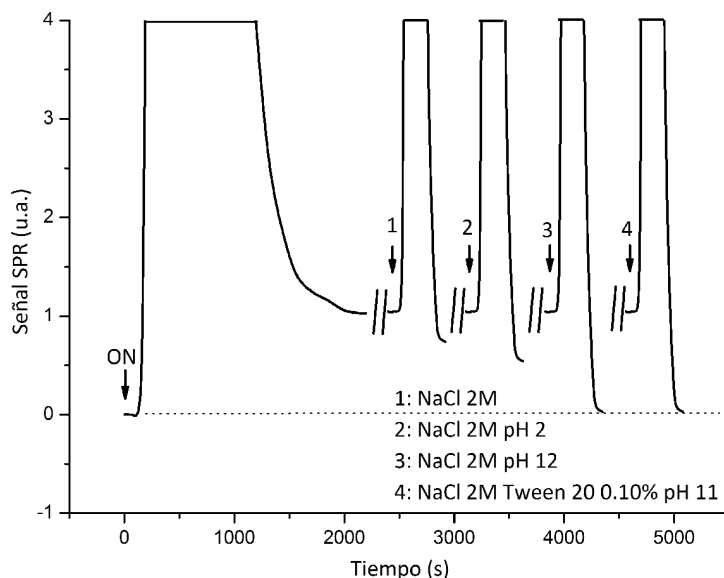


Figura 3.19. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por las muestras de suero y los posteriores ciclos con diferentes disoluciones de regeneración.

En la Figura 3.19 se muestran sensogramas representativos de estas medidas. Se escogió la combinación de regeneración de NaCl 2M, Tween 20 0.10% a pH 11 como

la disolución más adecuada para alcanzar la regeneración completa tras cada medida en suero, constituyendo esta mezcla las condiciones más suaves posibles.

3.4. Inmunoensayo de SPR para la determinación de hGH en suero

Una vez establecidas las condiciones de trabajo con muestras de suero se midieron en el sensor SPR con la hGH inmovilizada disoluciones de calibración por triplicado preparadas en suero humano con hGH en el rango de $4 \cdot 10^{-3}$ – 40 $\mu\text{g/mL}$ y muestras blanco. La Figura 3.14 muestra las señales SPR producidas por las mezclas del anticuerpo hGH-12 a 2 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S con estas muestras de suero que contienen concentraciones crecientes de hGH, donde podemos observar como la señal de SPR decrece a medida que aumenta la concentración de analito. Tras cada ciclo de medida, la unión se disocia mediante la inyección de la disolución de regeneración optimizada, lo que queda demostrado por la disminución de la señal de SPR hasta el nivel anterior a la asociación, quedando la superficie preparada para una nueva medida.

La curva de calibrado y las características analíticas del ensayo se muestran en la Figura 3.15. Este inmunoensayo de SPR es de utilidad para la determinación de un analito de interés clínico como la hGH en muestras de suero para niveles de concentración de 6 ng/mL a 1.3 $\mu\text{g/mL}$, situados dentro del rango de concentraciones fisiológicas. El ensayo se lleva a cabo en un reducido volumen de muestra (110 μL), de forma directa, rápida y sin ningún tipo de pretratamiento o dilución. Las medidas en muestras de suero se llevaron a cabo con los mismos parámetros de flujo que las medidas en tampón PBST, pero tras cada interacción, el tampón del ensayo necesita un tiempo adicional para lavar la superficie hasta alcanzar una señal estable, por lo que el tiempo de análisis para la determinación simultanea de dos muestras se alargó a 45 minutos, incluyendo el ciclo de regeneración correspondiente.

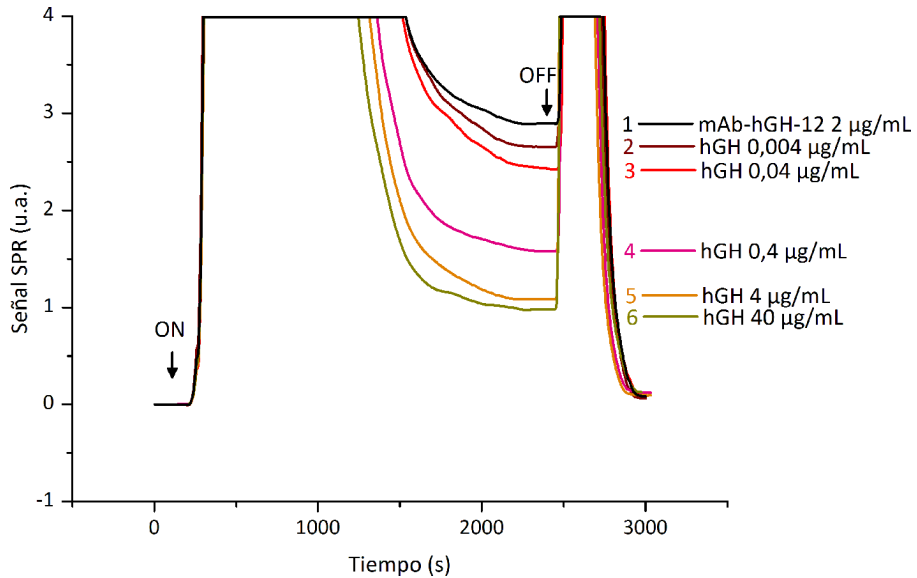


Figura 3.14. Sensogramas correspondientes a las señales de SPR producidas por una concentración constante de anticuerpo hGH-12 en presencia de diferentes concentraciones de hGH en suero humano y los correspondientes ciclos de regeneración.

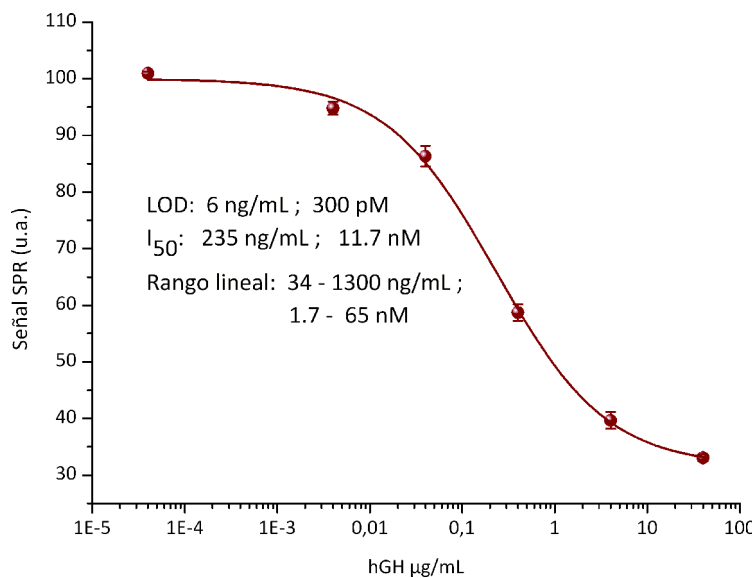


Figura 3.15. Curva de calibrado para la determinación de hGH en suero

3.4.1. Reproducibilidad

La reproducibilidad del inmunoensayo de SPR se estudió mediante la evaluación de la variabilidad en un mismo día y entre varios días. Para ello se midieron en tres días diferentes muestras por triplicado con concentraciones de 0.004, 0.04, 0.4 y 4 $\mu\text{g/mL}$ de hGH en suero. La Tabla 3.1 muestra los coeficientes de variación de las diferentes muestras en el día y entre días.

Tabla 3.1. Variaciones intra-ensayo e inter-ensayo para la determinación de muestras triplicadas de hGH mediante SPR a lo largo de un periodo de tres días.

	Concentración hGH (µg/mL)				Media
	0,004	0,04	0,4	4	
Variación intra-ensayo (R.S.D.%)					
Día 1	1,22	2,10	2,52	3,71	2,39
Día 2	0,57	1,22	0,81	3,16	1,44
Día 3	0,37	1,83	3,24	4,92	2,59
Variación inter-ensayo (R.S.D.%)					
Periodo 3 días	0,24	1,71	2,48	3,06	1,87

Los valores medios para la variación intra-ensayo fueron todos menores del 3% y la variación inter-ensayo media fue del 1.87%. Además, todos los coeficientes de variación individuales fueron menores del 5%. Estos datos se encuentran sobradamente dentro de la variabilidad aceptable para un método analítico.

También se comprobó la variabilidad del ensayo utilizando diferentes superficies sensoras. Se midieron curvas de calibrado con muestras por triplicado en idénticas condiciones experimentales usando tres superficies sensoras preparadas en diferentes ocasiones en el espacio de un año. La Figura 3.16 muestra las tres curvas de calibrado para las tres superficies sensoras probadas. La reproducibilidad entre superficies es excelente, con un coeficiente de variación del 2.19% y una variación del I_{50} entre 226 y 235 ng/mL .

3.4.1. Reutilización

Además de la reproducibilidad, la reutilización del biosensor es un punto clave de la robustez del inmunoensayo de SPR. La reutilización está relacionada con la estabilidad de la superficie sensora a lo largo de un determinado número de ciclos de medida y regeneración. Para comprobar la estabilidad del sensor se midieron muestras blanco, que proporcionan la máxima señal de SPR. En el caso del inmunoensayo en PBST, se consigue regenerar totalmente la superficie mediante una disolución de HCl 5 mM. La estabilidad del sensor se mantuvo durante más de 100 ciclos de medida y regeneración en cada celda de flujo, llevados a cabo en 10 días consecutivos, lo que hizo posible su uso continuado con un descenso máximo de la señal de SPR del 7% del valor inicial. En la Fig 3.17 se muestran los sensogramas correspondientes a algunas medidas representativas llevadas a cabo en ese periodo.

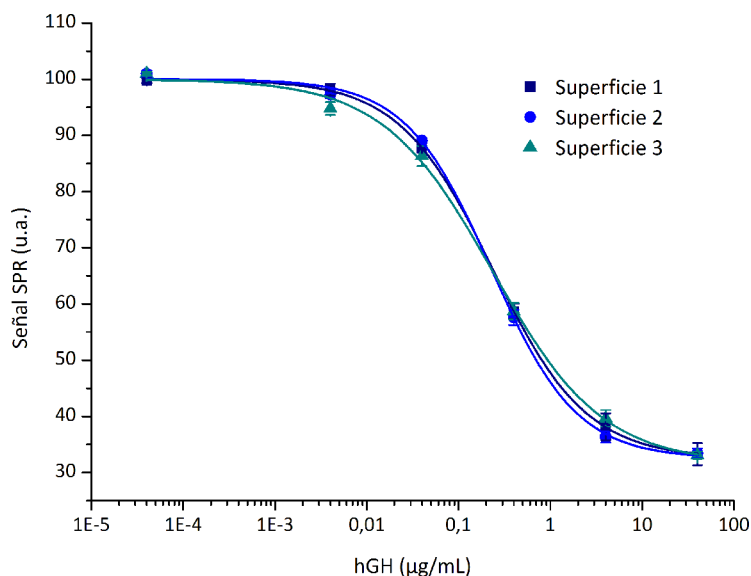


Figura 3.16. Curvas de calibrado de hGH para tres superficies sensoras diferentes.

En el caso de las medidas llevadas a cabo en muestras de suero, se observó una reutilización inferior, como consecuencia de los efectos de la matriz comentados anteriormente. Se necesitó emplear condiciones de regeneración más agresivas para alterar la unión entre el antígeno y el anticuerpo y a la vez desorber los componentes

del suero unidos inespecíficamente. Se consiguió la regeneración completa mediante una disolución de NaCl 2M, Tween 20 al 0.1% y pH 11. La estabilidad del sensor se mantuvo a lo largo de más de 50 ciclos de medida y regeneración en cada una de las celdas de flujo, llevados a cabo durante 5 días consecutivos, con un descenso máximo de la señal de SPR del 17% del valor inicial. En la Fig 3.17 se muestran los sensogramas correspondientes a algunas medidas representativas llevadas a cabo en ese periodo. Estas ligeras variaciones de la señal no afectan a la reproducibilidad del ensayo, ya que todas las medidas se normalizan respecto a la señal SPR máxima.

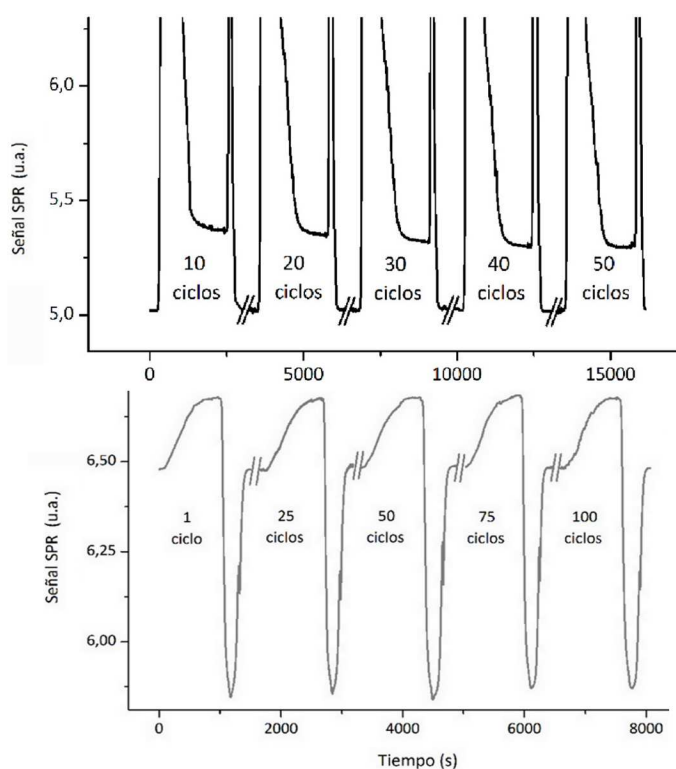


Figura 3.17. Evolución de la señal de SPR del anticuerpo a lo largo de los ciclos de medida y regeneración en PBST (gris) y suero (negro).

3.4.2. Comparación con el método ELISA. Análisis de muestras de suero

Finalmente se procedió a evaluar la precisión de la determinación de hGH mediante el inmunoensayo de SPR propuesto en este trabajo por comparación con el

método ELISA. Para ello se analizaron diez muestras de pacientes procedentes de pruebas dinámicas de deficiencia de hGH utilizando estos dos métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.2. Entre este grupo de muestras, cinco de ellas revelaron concentraciones por debajo del LOD del inmunoensayo de SPR situado en 6 ng/mL. Las cinco muestras restantes mostraron una excelente concordancia entre ambos métodos, con un $R^2 = 0.985$, como se muestra en la Figura 3.18. Estos datos indican que el método de inmunoensayo de SPR propuesto en este trabajo es adecuado para el diagnóstico de la deficiencia de hGH, ya que permite identificar las muestras con concentraciones de hGH por debajo del nivel de corte (10 ng/mL) y cuantificar con exactitud las muestras con concentraciones de hGH por encima de esta concentración.

Tabla 3.2. Comparación de los resultados obtenidos en el análisis de hGH en muestras reales de suero utilizando el método ELISA y el inmunoensayo de SPR. (n.d.: no detectable)

Nº de muestra	Concentración de hGH (ng/mL)	
	ELISA	SPR
1	n.d.	n.d.
2	3.6	n.d.
3	3	n.d.
4	20.1	21.3
5	n.d.	n.d.
6	36.4	32
7	17	19
8	6	7.8
9	6.8	9
10	n.d.	n.d.

3.5. Conclusiones

El método de inmunoensayo de SPR demuestra la utilidad del biosensor para la determinación de un analito de relevancia clínica como es la hGH en muestras reales de suero. El método hace posible una determinación rápida, sin necesidad de marcadores, en tiempo real y haciendo uso de un reducido volumen de muestra. Este inmunosensor de SPR es capaz de determinar el analito de forma directa y sin ningún tipo de pretratamiento en muestras de suero. Según nuestro conocimiento este es el primer

biosensor para la determinación de hGH y la primera aplicación de un biosensor de SPR que permite llevar a cabo la determinación directa de un analito en muestras de suero en niveles de concentración de relevancia sin necesidad de dilución o pretratamiento [12].

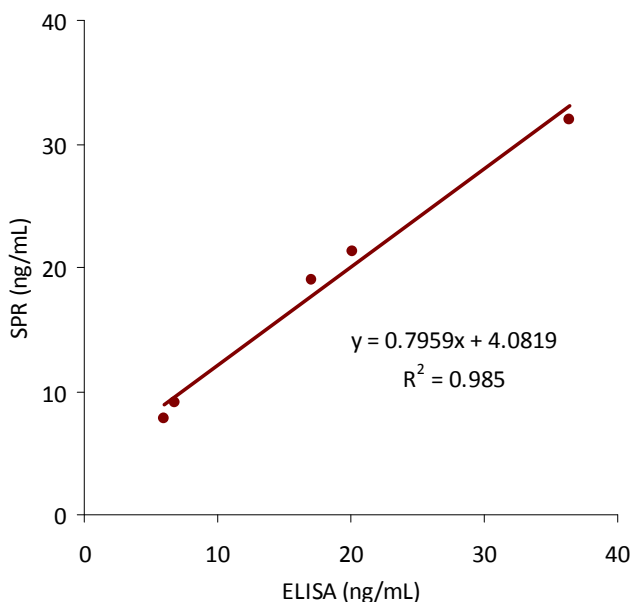


Figura 3.18. Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de hGH en muestras reales mediante el método ELISA y el inmunoensayo SPR.

La robustez del método quedó verificada por la excelente reproducibilidad y la estabilidad de la señal a lo largo de los numerosos ciclos de medida y regeneración. La señal permaneció estable durante 5 días de funcionamiento continuo. La reproducibilidad del método quedó probada por los bajos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo y por la reducida variación entre diferentes superficies sensoras. La validación de la determinación de hGH en muestras de suero procedentes de pruebas de estimulación para el diagnóstico de deficiencia de hGH se llevó a cabo por comparación con el método ELISA. La buena correlación de los datos demuestra que la aplicación de ésta técnica puede ser de gran utilidad como herramienta de diagnóstico rápido tanto en laboratorios clínicos como en puntos de atención primaria (POC). Este estudio abre el camino para el desarrollo de este biosensor SPR como una herramienta portátil de

diagnóstico para la detección de múltiples analitos clínicos en muestras biológicas y para el seguimiento de marcadores proteicos de diferentes enfermedades.

3.6. Referencias

1. Lu, B., M.R. Smyth, and R. O'Kennedy, *Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors*. Analyst, 1996. **121**(3): p. 29-32.
2. Grabarek, Z. and J. Gergely, *Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters*. Analytical Biochemistry, 1990. **185**(1): p. 131-135.
3. Bain, C.D. and G.M. Whitesides, *A study by contact angle of the acid-base behavior of monolayers containing .omega.-mercaptocarboxylic acids adsorbed on gold: an example of reactive spreading*. Langmuir, 1989. **5**(6): p. 1370-1378.
4. Creager, S.E. and J. Clarke, *Contact-Angle Titrations of Mixed .omega.-Mercaptoalkanoic Acid/Alkanethiol Monolayers on Gold. Reactive vs Nonreactive Spreading, and Chain Length Effects on Surface pKa Values*. Langmuir, 1994. **10**(10): p. 3675-3683.
5. Johnsson, B., S. Löfås, and G. Lindquist, *Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors*. Analytical Biochemistry, 1991. **198**(2): p. 268-277.
6. Hock, B., *Antibodies for immunosensors - A review*. Analytica Chimica Acta, 1997. **347**(1-2): p. 177-186.
7. Harper, R.G., et al., *Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1299-1306.
8. Tirumalai, R.S., et al., *Characterization of the low molecular weight human serum proteome*. Molecular & Cellular Proteomics, 2003. **2**(10): p. 1096-1103.
9. Haasnoot, W., et al., *Application of a multi-sulfonamide biosensor immunoassay for the detection of sulfadiazine and sulfamethoxazole residues in broiler serum and its use as a predictor of the levels in edible tissue*. Analytica Chimica Acta, 2005. **552**(1-2): p. 87-95.
10. Yang, C.Y., et al., *Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR*. Lab on a Chip, 2005. **5**(10): p. 1017-1023.
11. Johansson, M.A. and K.E. Hellenäs, *Matrix effects in immunobiosensor determination of clenbuterol in urine and serum*. The Analyst, 2004. **129**(5): p. 438-442.
12. Homola, J., *Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species*. Chemical Reviews, 2008. **108**(2): p. 462-93.

4. Inmunoensayo SPR multianalito para la determinación de gonadotropinas en muestras de orina

4.1. Inmovilización de las hormonas

En el caso de la determinación de las gonadotropinas hFSH y hLH se eligió un formato de inmunoensayo de inhibición por las mismas razones expuestas en el punto 3.1 para la determinación de hGH. El proceso de inmovilización se llevó a cabo de nuevo mediante la formación de una SAM de MUA sobre la superficie de oro y el posterior acoplamiento con los grupos amino de la proteína. El primer paso para encontrar las condiciones óptimas de inmovilización fue la elección del pH de inmovilización. Las señales obtenidas al inyectar diferentes disoluciones de hFSH y

hLH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en pH comprendidos entre 3.5 y 8 en el sensor modificado con la SAM de MUA sin activar se muestran en la Figura 4.1.

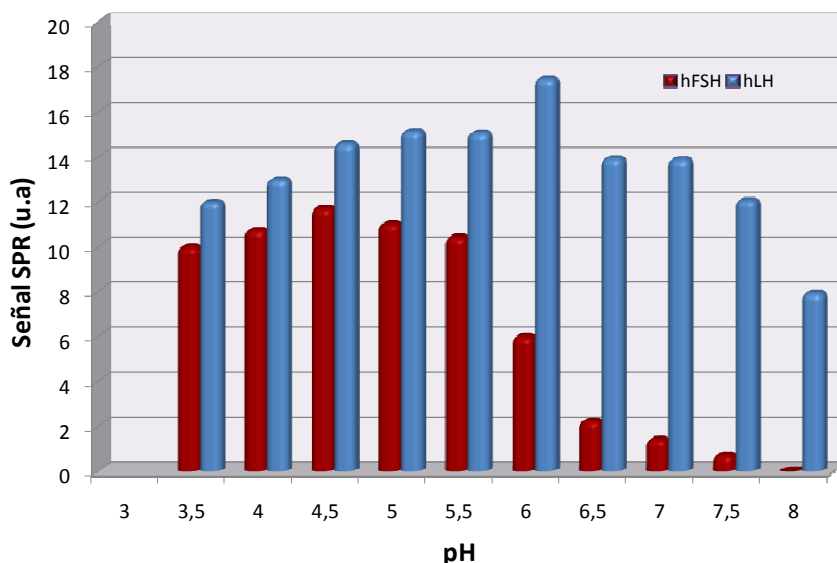


Figura 4.1. Representación de las señales SPR producidas por la adsorción de hFSH y hLH sobre la superficie sin activar utilizando disoluciones de diferentes pHs

Los resultados obtenidos son acordes con el mecanismo explicado en el punto 3.1 y con los puntos isoeléctricos de las hormonas, de entorno a 5 para la hFSH y de entorno a 7 para la hLH. La diferencia respecto del caso de la hGH, de origen recombinante y por tanto de estructura y propiedades más homogéneas, reside en que estas hormonas son de origen pituitario, por lo que presentan varias isoformas con puntos isoeléctricos diferentes [1] y su adsorción sobre la superficie se produce en un intervalo de pHs más amplio. Además, podemos observar como la adsorción es mucho mayor para la hLH que para la hFSH, lo que puede ser debido a que a pHs más altos, existe una proporción más grande de grupos carboxilo cargados en la superficie, por lo que el efecto electrostático se produce en mayor medida en el entorno del pI de la hLH. En relación a éstos resultados las hormonas se inmovilizaron utilizando tampones con 10 mM de acetato a pH 4.5 para la hFSH y a pH 6 para la hLH.

Seguidamente se examinó la concentración de inmovilización más adecuada, para lo que se probaron concentraciones de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Se eligió, en ambos casos, una concentración de inmovilización de 25 $\mu\text{g/mL}$, que es suficiente para

alcanzar el nivel máximo de inmovilización, proporcionando al mismo tiempo una sensibilidad adecuada para llevar a cabo el inmunoensayo.

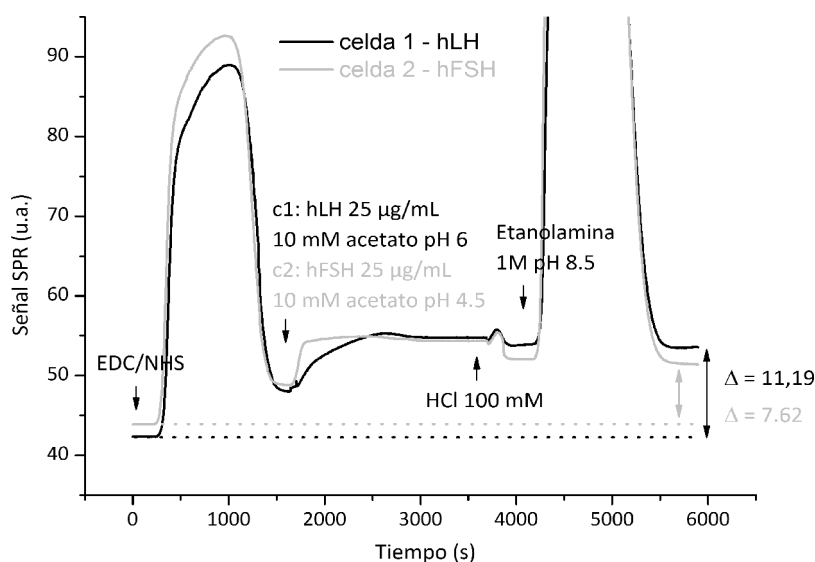


Figura 4.2. Sensograma del proceso de inmovilización de las hormonas en las dos celdas del sensor SPR. Celda 1: hLH; celda 2: hFSH

En la Figura 4.2 se presenta un sensograma en tiempo real de la inmovilización de la hFSH y hLH, independientemente, en cada una de las dos celdas de flujo del equipo. En primer lugar se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó la disolución de hormona correspondiente, produciéndose un incremento en la señal SPR debida a su inmovilización. Mediante una disolución de HCl 100 mM nos aseguramos de que todas las moléculas que permanecen en la superficie están unidas covalentemente, desprendiendo todas las moléculas que se encuentren adsorbidas físicamente. Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina. El incremento de señal SPR respecto al inicio de la inmovilización nos da una idea de la cantidad de hormona inmovilizada, aunque es la señal producida por la unión del anticuerpo específico la que nos proporciona información de la funcionalidad de la capa formada. Podemos observar como, en el caso de la hFSH, se produce un incremento de señal menor que para la hLH que puede deberse al menor efecto de preconcentración que hemos observado en el estudio previo.

También se utilizó un nuevo enfoque para la determinación multianalito mediante el cual las dos hormonas se inmovilizaron simultáneamente en la misma celda de flujo. La determinación multianalito ha sido demostrada previamente para la determinación de dos o tres analitos en cada celda de flujo, expandiendo la capacidad del dispositivo para la determinación de hasta seis analitos diferentes en un solo ciclo de medida [2, 3].

Para obtener un funcionamiento similar al formato de inmovilización individual, se probaron varias combinaciones de concentraciones de inmovilización de hFSH y hLH. Para ello, se utilizaron varias superficies sensoras preparadas utilizando disoluciones con diferentes proporciones de las hormonas. Se utilizó un tampón de inmovilización 10 mM de acetato a pH 4.5, ya que a éste pH se obtiene la mejor preconcentración para la hFSH manteniendo un buen comportamiento para la hLH (Fig 4.1), ya que ésta última se ve menos afectada por éste factor. Tras completar el proceso de inmovilización se inyectaron los anticuerpos específicos de cada una de las hormonas en cada una de estas superficies. En la Tabla 4.1 se muestran las señales producidas por la unión de los anticuerpos específicos en las superficies preparadas con diferentes proporciones de las hormonas en la disolución de inmovilización.

Tabla 4.1. Evaluación de las señales SPR de la interacción hormona-anticuerpo utilizando varias combinaciones de concentraciones en la mezcla de inmovilización

Señal SPR	hFSH/hLH $\mu\text{g mL}^{-1}$					
	12.5/12.5	16.7/8.3	25/25	17/33	20/40	25/50
mAb-hFSH-14 $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$	0.55	0.46	0.61	0.38	0.59	0.69
mAb-hLH-7 $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$	0.31	0.44	0.24	0.56	0.35	0.5

Como podemos deducir de los resultados, las disoluciones con una proporción de hFSH y hLH de 1:2 producen señales de reconocimiento de los dos anticuerpos muy similares. La combinación óptima que maximiza la señal SPR del anticuerpo específico de cada hormona es de 25 $\mu\text{g/mL}$ de hFSH y 50 $\mu\text{g/mL}$ de hLH. En la Figura 4.3 se muestran un sensograma en tiempo real correspondiente a la inmovilización simultánea de las dos hormonas en la misma superficie sensora. Los diferentes pasos del proceso de inmovilización ya han sido explicados extensamente con anterioridad.

Podemos concluir que no solo la concentración de cada hormona es crucial para el funcionamiento óptimo del sensor sino que también es necesaria una adecuada proporción (1:2) entre sus concentraciones. Es necesario encontrar una relación entre estos dos factores que permita mantener una distribución adecuada de las dos hormonas en la superficie, consiguiendo así una sensibilidad similar a la del inmunoensayo individual para cada analito.

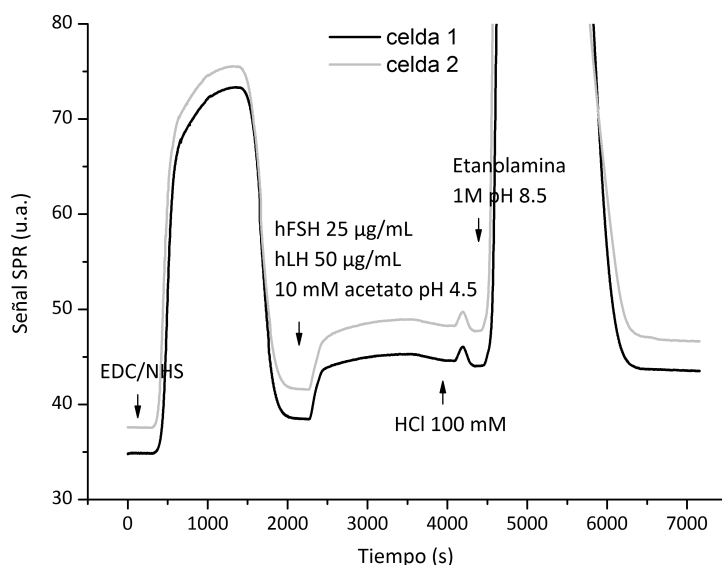


Figura 4.3. Sensograma correspondiente al proceso de inmovilización simultánea de las dos hormonas en las dos celdas de flujo del sensor SPR. Celda 1, negro; celda 2, gris.

4.2. Inmunoensayo multianalito SPR para la determinación de hFSH y hLH en PBST

4.2.1. Formato de inmovilización individual. Selección de anticuerpos

En primer lugar se caracterizó el inmunoensayo SPR para la detección de las hormonas hFSH y hLH en tampón PBST utilizando el formato de inmovilización individual. Se probaron los anticuerpos disponibles para cada hormona (Tabla 2.1) en

su sensor correspondiente, para comprobar su capacidad para la unión a la hormona inmovilizada. En este caso, a diferencia del anticuerpo hGH-12, los anticuerpos fueron purificados únicamente por precipitación en sulfato amónico. Debido a que se observó un funcionamiento adecuado no se consideró necesario llevar a cabo una purificación por afinidad. Se escogieron los anticuerpos hFSH-1, hFSH-2, hFSH-9 y hFSH-14 para la hFSH y hLH-6 y hLH-7 para la hLH, debido a que presentan una mejor señal SPR al unirse con el antígeno inmovilizado en la superficie, como puede observarse en la Figura 4.4.

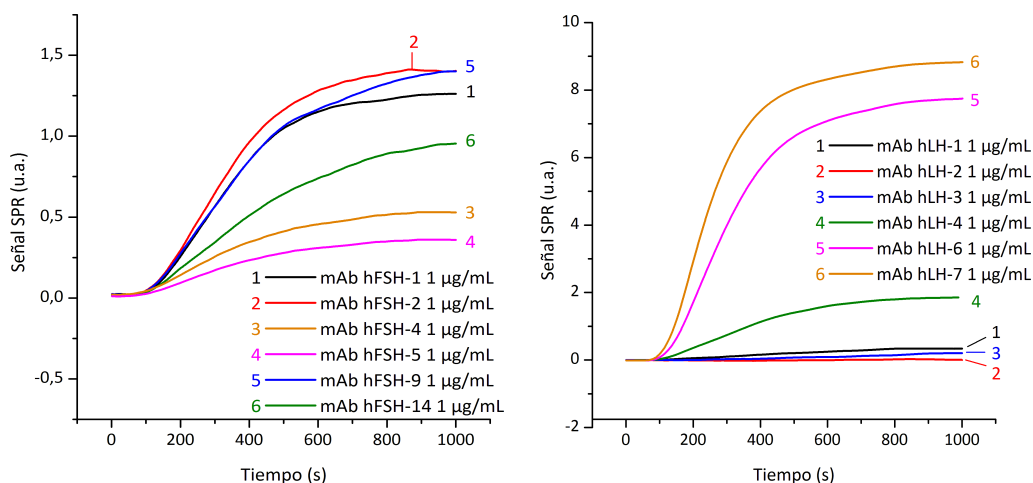


Figura 4.4. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por los diferentes anticuerpos específicos de cada una de las hormonas en su sensor correspondiente.

Seguidamente, se optimizó la concentración de anticuerpo para llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición, ya que, como hemos comentado en el punto 3.2, éste parámetro tiene una gran influencia en sus características analíticas. Con este fin se probaron concentraciones de 0.25, 0.50 y 1 µg/mL de los anticuerpos hFSH-1, hFSH-2, hFSH-9 y hFSH-14 para la hFSH y de 0.025, 0.05 y 0.1 µg/mL de hLH-6 y hLH-7 para la hLH. Las concentraciones de 0.5 µg/mL de los anticuerpos de hFSH y de 0.05 µg/mL de los anticuerpos de hLH se mostraron suficientes para proporcionar una señal SPR adecuada para llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición.

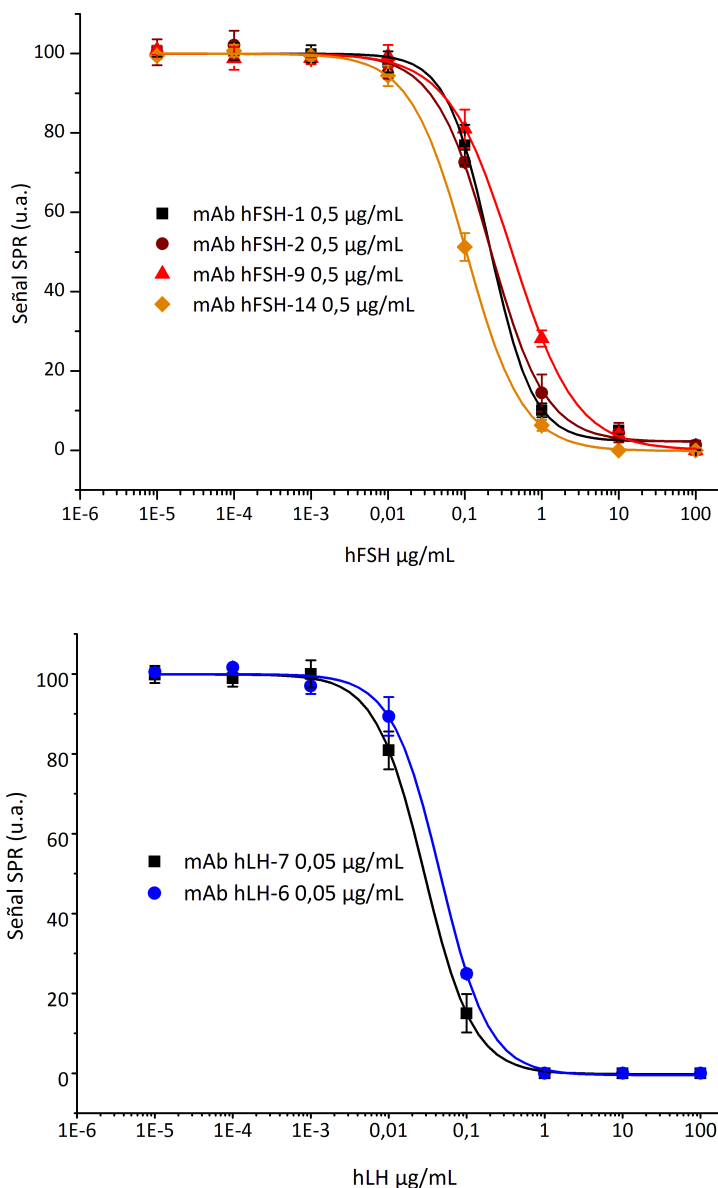


Figura 4.5. Comparación de las curvas de calibrado para la determinación de hFSH y hLH obtenidas utilizando diferentes anticuerpos

A continuación, se eligieron los anticuerpos que producen la mejor sensibilidad del ensayo. Para ello se midieron curvas de calibrado en el formato de inmunoensayo de inhibición utilizando los diferentes anticuerpos específicos de cada una de las hormonas. Se probaron los anticuerpos hFSH-1, hFSH-2, hFSH-9 y hFSH-14 a una

concentración de 0.5 µg/mL en el sensor de hFSH y los anticuerpos hLH-6 y hLH-7 a una concentración de 0.05 µg/mL en el sensor de hLH. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la Figura 4.5. Teniendo en cuenta las características analíticas de los ensayos, mostradas en la Tabla 4.2, se eligió el anticuerpo hFSH-14 para llevar a cabo la determinación de la hFSH y el anticuerpo hLH-7 para el caso de la hLH.

Tabla 4.2. Características analíticas del inmunoensayo SPR para hFSH y hLH utilizando diferentes anticuerpos

Analytical characteristics	hFSH				hLH	
	mAb-hFSH-1	mAb-hFSH-2	mAb-hFSH-9	mAb-hFSH-14	mAb-hLH-6	mAb-hLH-7
LOD (ng mL ⁻¹)	32	19	24	8	9	3
I ₅₀ (ng mL ⁻¹)	212	213	408	105	45	29
Working range (ng mL ⁻¹)	88-560	68-735	108-1547	32-327	17-123	10-78

En la Figura 4.6 se muestran las señales SPR producidas por disoluciones con una concentración constante de anticuerpo hFSH-14 y hLH-7 en presencia de concentraciones crecientes de hFSH y hLH respectivamente. Al final de cada ciclo de medida se disocia la unión mediante la inyección de una disolución de regeneración de HCl 5 mM, lo que queda demostrado por la disminución de la señal SPR hasta el nivel anterior a la asociación, quedando preparada la superficie para el siguiente ciclo de medida.

Se comprobó la especificidad de estos biosensores por su anticuerpo correspondiente en comparación con anticuerpos monoclonales específicos del resto de las hormonas pituitarias. Para ello se fluyeron disoluciones de 1 µg/mL de los anticuerpos hTSH-1, hLH-7 y hGH-12 en el sensor de hFSH y hTSH-1, hFSH-14 y hGH-12 en el sensor de hLH utilizando las mismas condiciones experimentales. La especificidad de los sensores de hFSH y hLH quedó demostrada por la inapreciable señal SPR producida por estos anticuerpos, como se muestra en la Fig 4.7.

La reactividad cruzada de los anticuerpos hFSH-14 y hLH-7 con el resto de las hormonas pituitarias se comprobó también inyectando mezclas del anticuerpo hFSH-14 a 0.5 µg/mL con las hormonas hTSH, hGH o hLH a 10 µg/mL en el sensor de hFSH y mezclas del anticuerpo de hLH-7 a 0.05 µg/mL con las hormonas hTSH, hGH o hFSH a 10 µg/mL en el sensor de hLH. La presencia de estas hormonas no produjo inhibición

apreciable en la señal SPR debida al anticuerpo, como puede observarse en la Figura 4.8. La presencia de las demás hormonas no tiene ningún efecto sobre la señal producida por la interacción específica, lo que demostró que los anticuerpos son suficientemente selectivos para no reconocer el resto de hormonas presentes en la disolución, permitiendo así llevar a cabo la detección de estas sustancias en muestras complejas que contengan más de una de éstas hormonas.

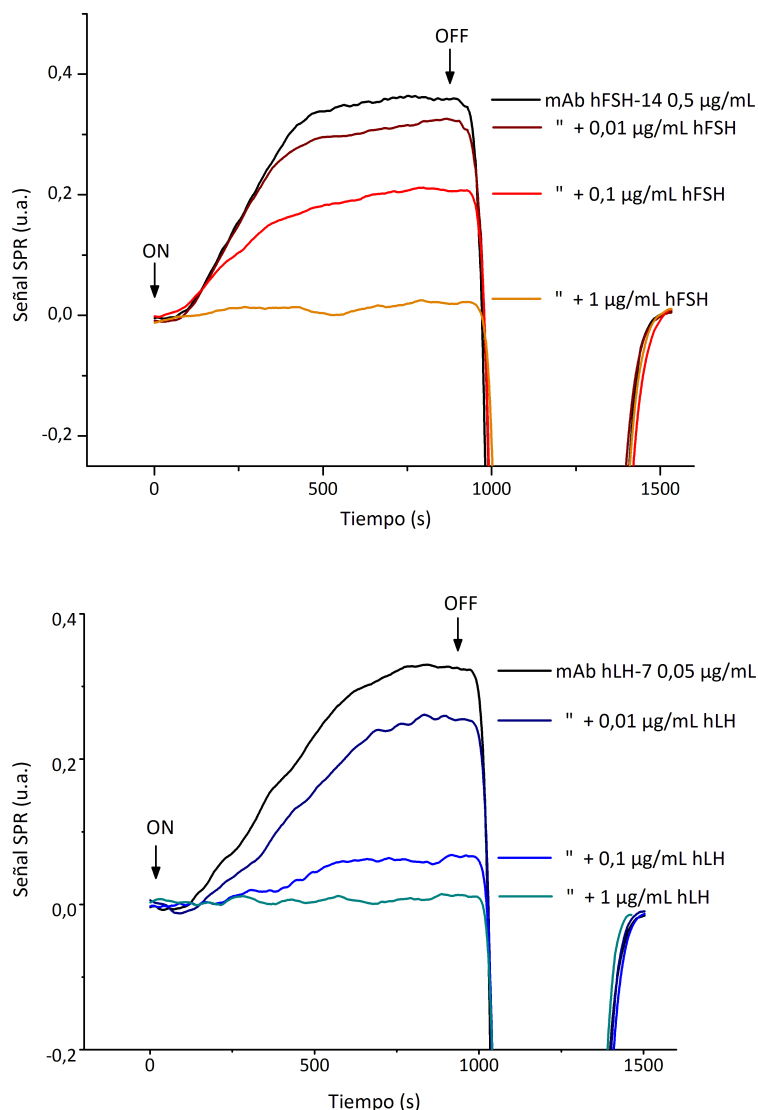


Figura 4.6. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por una concentración constante del anticuerpo en presencia de diferentes concentraciones de hormona y los correspondientes ciclos de regeneración.

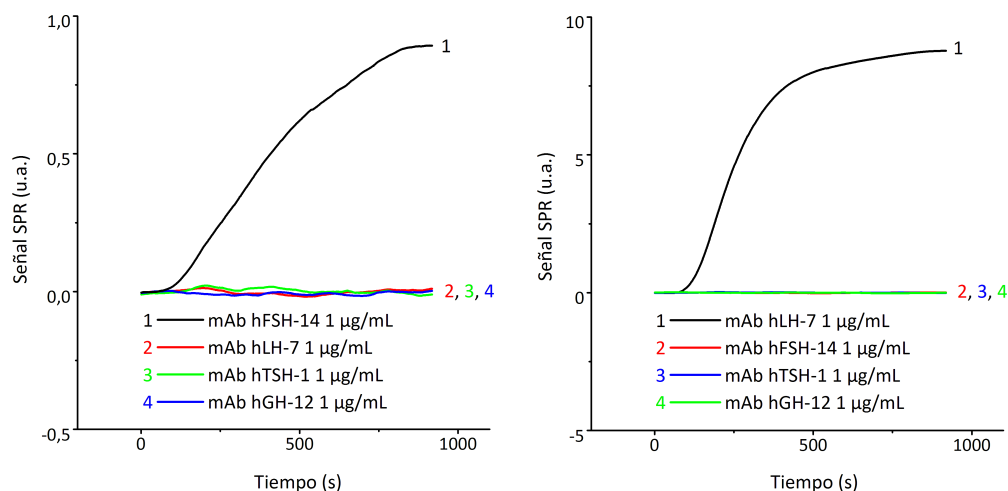


Figura 4.7. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por el anticuerpo específico de cada hormona y los anticuerpos inespecíficos en el sensor de hFSH y hLH

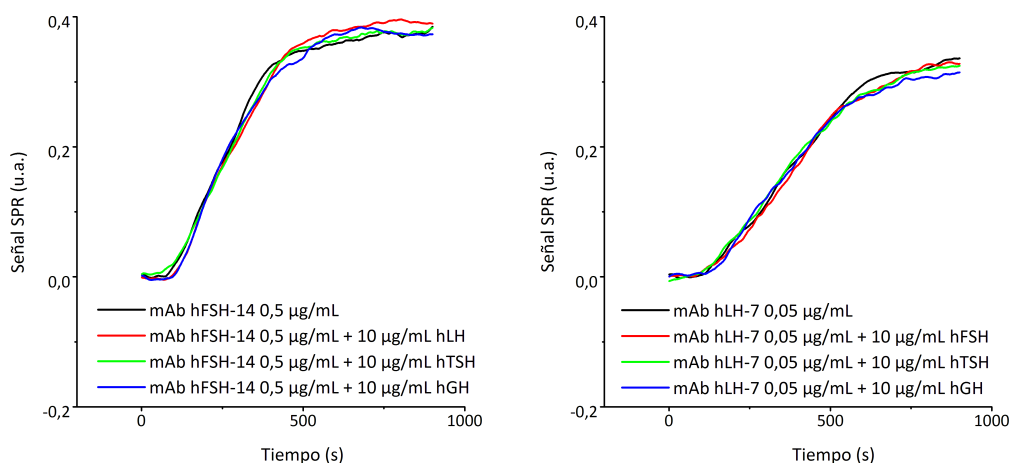


Figura 4.8. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por los anticuerpos específicos de cada hormona en presencia de las demás hormonas pituitarias

4.2.1. Formato de inmovilización simultánea

Una vez establecido el funcionamiento del inmunoensayo individual de forma paralela en las dos celdas de flujo del dispositivo, se probó un formato alternativo basado en la utilización de superficies sensoras preparadas mediante la inmovilización

simultánea de ambas hormonas. Este formato puede ser de gran utilidad siempre y cuando las señales SPR producidas por la unión del anticuerpo correspondiente al antígeno inmovilizado en la superficie y, por tanto, la sensibilidad del ensayo sean similares a las obtenidas utilizando el formato individual. El factor clave para el buen funcionamiento del formato de inmovilización simultánea es una adecuada accesibilidad y distribución de los antígenos en la superficie, como ya se ha explicado anteriormente en el punto 4.1.

En el inmunoensayo de inhibición se incubaba cada muestra con el anticuerpo correspondiente a la hormona que se quiere determinar en ella antes de inyectarla en el sensor, por lo que, gracias a la elevada selectividad de los anticuerpos, se puede determinar cada hormona de forma independiente. Se estudió el funcionamiento del inmunoensayo de inhibición mediante dos protocolos diferentes, basados en el análisis secuencial o aditivo de las muestras [2, 3]. En el protocolo secuencial se llevan a cabo ciclos de medida independientes para cada analito, en un orden en el que, en cada ciclo de análisis, la determinación de cada analito en cada una de las muestras va seguida de su correspondiente ciclo de regeneración. Alternativamente, el protocolo aditivo consiste en el análisis sucesivo de dos muestras, una para cada uno de los analitos, tras las cuales se lleva a cabo un único ciclo de regeneración, por lo que el tiempo global de análisis se ve reducido. En la Figura 4.9 se muestra una representación esquemática de ambos protocolos y en la Figura 4.10 se presentan algunos sensogramas ilustrativos.

En primer lugar se evaluaron las concentraciones de anticuerpo optimizadas en el formato de inmovilización individual usando ahora las superficies con las dos hormonas inmovilizadas. En el caso del mAb hLH-7, la inyección de 0.05 $\mu\text{g/mL}$ produjo un resultado equivalente al que se obtuvo para el formato de inmovilización individual, mientras que la inyección del mAb hFSH-14 a 0.5 $\mu\text{g/mL}$ produjo una señal mayor que la obtenida en el formato anterior. Este efecto podría deberse a que la distribución superficial de la hFSH, al estar rodeada por moléculas de hLH, sea más favorable para la unión del anticuerpo. Debido a esto, la concentración del mAb hFSH-14 para el inmunoensayo de inhibición se redujo de 0.5 a 0.3 $\mu\text{g/mL}$ con la intención de mejorar la sensibilidad del ensayo y al mismo tiempo tener un menor gasto de reactivo.

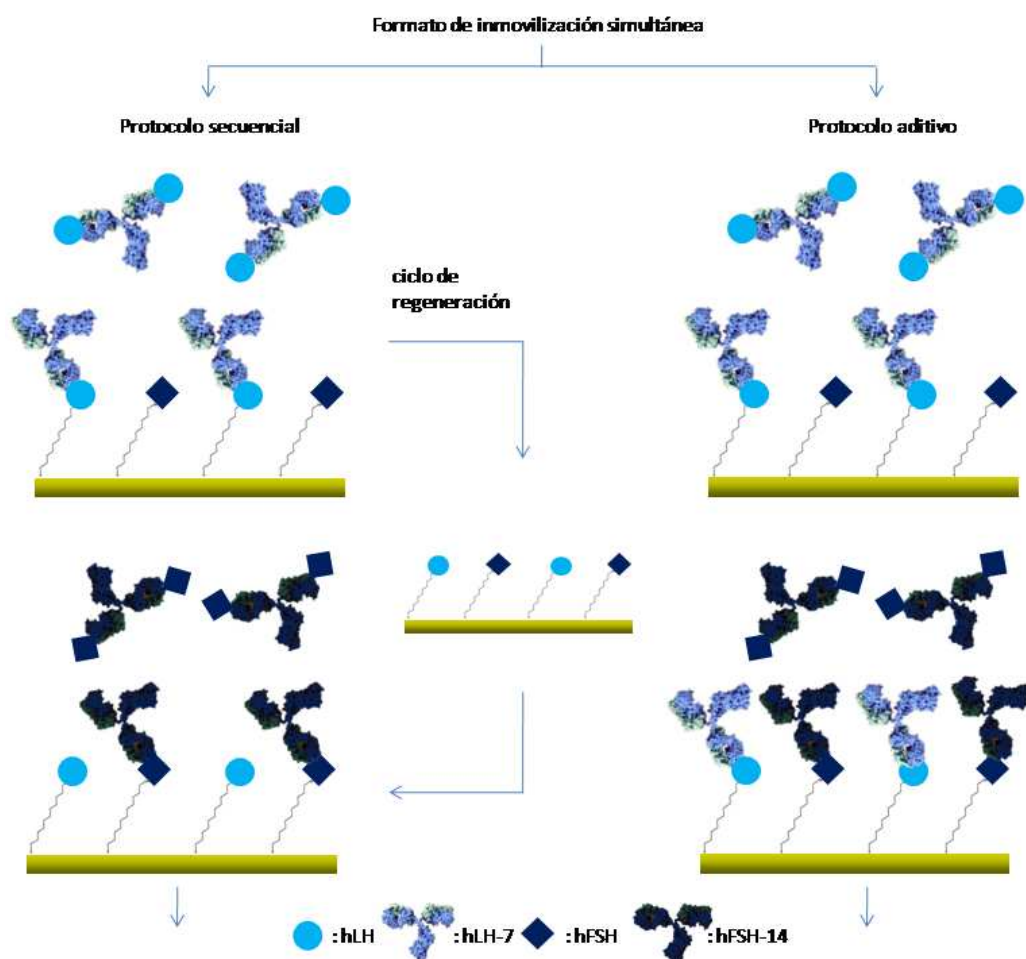


Figura 4.9. Representación esquemática de los dos protocolos de análisis multianálito y sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por los anticuerpos específicos de cada hormona.

Se prepararon muestras de calibrado y muestras blanco, se mezclaron con el anticuerpo correspondiente y se inyectaron en el sensor siguiendo los protocolos secuencial o aditivo. En el caso del protocolo aditivo, el orden de inyección de las muestras podría influir la señal SPR producida por cada anticuerpo en presencia del otro, debido a ello, se evaluaron las dos secuencias de inyección posibles. En la Figura 4.11 se muestran las curvas de calibrado para la detección de hFSH y hLH obtenidas mediante el formato de inmovilización individual comparadas con las correspondientes al formato de inmovilización simultánea, tanto en el protocolo

secuencial como en los dos órdenes de inyección posibles del formato aditivo. Las características analíticas de los diferentes formatos de ensayo se muestran en la Tabla 4.3.

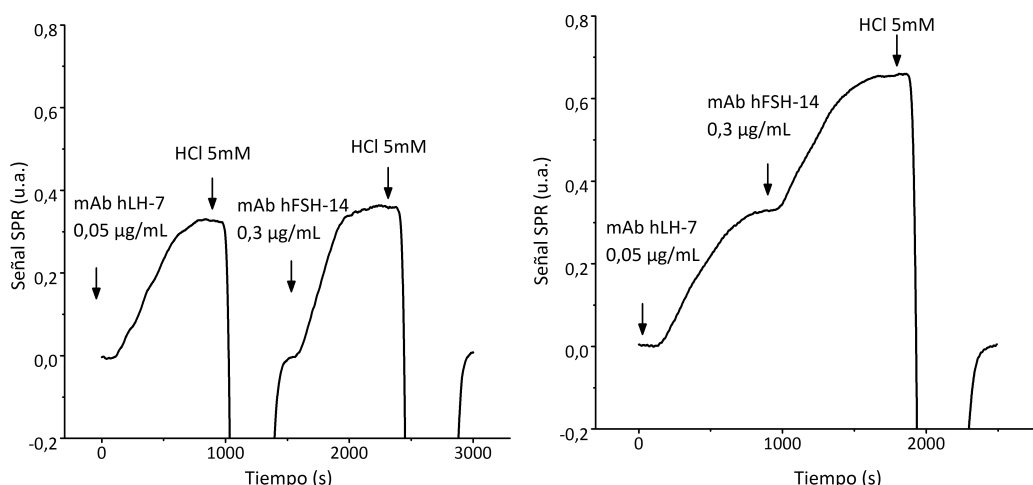


Figura 4.10. Representación esquemática de los dos protocolos de análisis multianálito y sensoqramas correspondientes a las señales SPR producidas por los anticuerpos específicos de cada hormona.

Tabla 4.3. Características analíticas del inmunoensayo SPR para hFSH y hLH utilizando diferentes formatos

hFSH	Individual	Secuencial	Aditivo hFSH/hLH	Aditivo hLH/hFSH
LOD (ng mL^{-1})	8	2	2	4
I_{50} (ng mL^{-1})	105	70	109	133
Rango lineal (ng mL^{-1})	32-327	14-370	14-803	24-723
hLH	Individual	Secuencial	Aditivo hLH/hFSH	Aditivo hFSH/hLH
LOD (ng mL^{-1})	3	5	7	4
I_{50} (ng mL^{-1})	29	36	37	44
Rango lineal (ng mL^{-1})	10-78	15-85	17-81	14-131

El análisis de los resultados muestra que la utilización de la inmovilización simultánea tiene muy poco efecto en el funcionamiento del ensayo de hLH, mientras que en el caso de la hFSH la sensibilidad se ha visto mejorada respecto al formato de inmovilización individual, debido a la reducción de la concentración de anticuerpo para el ensayo. Se puede extraer otra conclusión, que es la semejanza de las curvas ya se

utilice un formato secuencial o aditivo. El formato aditivo, se ve además muy poco afectado por el orden de inyección de las muestras.

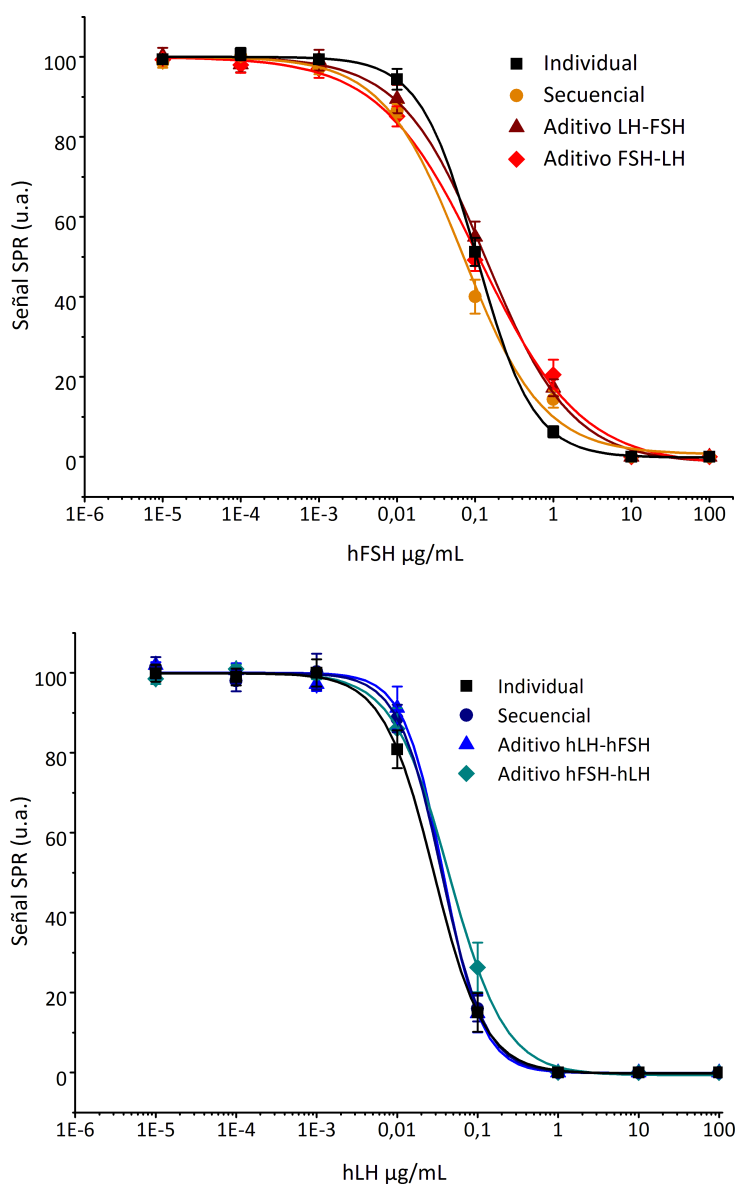


Figura 4.11. Comparación de las curvas de calibrado para la determinación de hFSH y hLH obtenidas utilizando diferentes formatos de ensayo

Este inmunoensayo SPR permite la determinación simultánea de hFSH y hLH en cada una de las celdas del dispositivo o, de forma simultánea, en la misma celda, de forma sencilla y rápida. Utilizando el formato secuencial, se puede evaluar cada muestra en 25 minutos, incluyendo la interacción de cada anticuerpo seguida de su ciclo de regeneración correspondiente. Esto supone, utilizando las dos celdas de flujo del dispositivo, una velocidad de procesamiento de 4.8 muestras/hora. Por otro lado, el protocolo aditivo incluye la medida sucesiva de dos muestras, cada una correspondiente a uno de los analitos, con un solo ciclo de regeneración posterior, por lo que el análisis de las dos muestras puede realizarse en 40 minutos. De esta manera, utilizando las dos celdas de flujo, se llega a una velocidad de procesamiento de 6 muestras/hora. La utilización del formato aditivo, además de reducir el tiempo de análisis, expone menos el receptor a los posibles daños causados por las condiciones de regeneración y además permite utilizar un mismo dispositivo para el análisis de dos analitos.

El ensayo de hFSH presenta el límite de detección más bajo, 2 ng/mL, que referido a los estándares internacionales corresponde a 29 mIU/mL. En el caso de la hLH el límite de detección es de 3 ng/mL, equivalente a 26 mIU/mL. Ambos límites se encuentran en un orden de concentración adecuado para la determinación de hFSH y hLH como marcadores de enfermedades. Una vez establecidos los parámetros del proceso de inmovilización y del inmunoensayo en disolución tampón, se pasó a investigar las condiciones necesarias para poder llevar a cabo la determinación de los analitos en muestras de orina.

4.3. Inmunoensayo multianalito SPR para la determinación de hFSH y hLH en orina

La orina es una muestra biológica ideal para la determinación de biomarcadores de enfermedades ya que puede obtenerse en grandes cantidades, de forma simple y no invasiva, lo que es muy ventajoso para el diagnóstico, ya que permite tomar muestras de forma repetida durante periodos de tiempo prolongados. Por otro lado, su baja concentración de proteínas, su alto contenido en sales y sustancias interferentes y su alto grado de variaciones, tanto intra- como interindividuales presentan un reto para su

análisis [4]. La concentración de proteínas de la orina es menor de 0,1 mg/mL en un donante normal con una excreción de proteínas menor de 150 mg/día, lo que supone un contenido alrededor de 1000 veces menor que otros fluidos biológicos como el suero sanguíneo, que presenta una concentración de proteínas de 60 – 80 mg/mL [5, 6].

Los experimentos previos llevados a cabo con orina mostraron que la unión inespecífica de sus componentes sobre la SAM funcionalizada con las hormonas es bastante reducida en comparación con la producida en el caso del suero, como puede observarse en la Figura 4.12. Como ya se ha comentado en el apartado 3.3, las señales SPR producidas consisten en un aumento brusco, debido a la contribución del índice de refracción de la muestra más la señal debida a la interacción inespecífica de los componentes de la matriz con la superficie. Debido al bajo contenido en proteínas de la orina, la interacción inespecífica con la superficie es muy reducida, suponiendo tan sólo un 0.8 % de la señal inespecífica producida por el suero utilizando PBST como tampón del ensayo y un 7 % de la señal inespecífica producida por el suero utilizando el tampón optimizado PBST-S. Además, en el caso de la orina, se alcanza una señal estable en un tiempo notablemente menor, lo que reduce el tiempo de análisis comparado con la medida de muestras de suero.

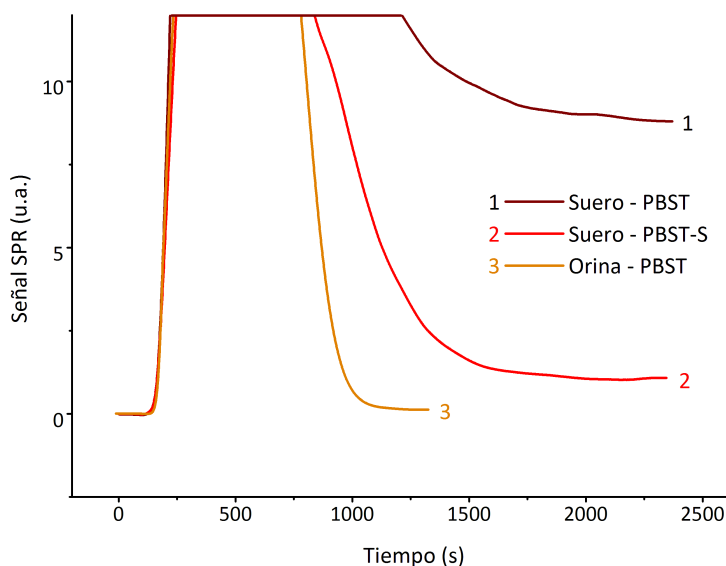


Figura 4.12. Comparación de los sensogramas producidos por las muestras de suero y orina utilizando diferentes tampones de ensayo

La señal de fondo debida a la interacción inespecífica de los componentes de la orina supone alrededor de un 15 % de la señal específica del anticuerpo, lo que permite llevar a cabo una detección adecuada sin necesidad de cambiar la composición del tampón ni aumentar la concentración de anticuerpo, como ocurría en el caso de la medida de hGH en suero. En cuanto a la regeneración de la superficie, se logra completamente utilizando una disolución de HCl 5 mM, por lo que no es necesario realizar un estudio más profundo de las condiciones de regeneración como el llevado a cabo en el caso del suero. Las medidas en orina se efectuaron utilizando los mismos parámetros de flujo que en PBST, pero tras cada interacción, el tampón necesita fluir durante 5 minutos para limpiar la superficie hasta que la señal alcance un valor estable, lo que alarga el ciclo de medida y regeneración a 30 minutos.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo con muestras de orina se midieron en el sensor SPR disoluciones de calibración por triplicado de hFSH y hLH en el rango de 10^{-4} – 100 µg/mL y muestras blanco preparadas en orina. La Figura 4.13 muestra las señales SPR producidas por las mezclas del anticuerpo con muestras de orina que contienen concentraciones crecientes de analito, donde podemos observar como la señal SPR decrece a medida que aumenta la concentración de analito. Tras cada ciclo de medida, la unión se disocia mediante la inyección de la disolución de regeneración de HCl 5 mM, lo que queda demostrado por la disminución de la señal SPR hasta el nivel anterior a la asociación, quedando la superficie preparada para una nueva medida.

La Figura 4.14 muestra las curvas de calibrado de hFSH y hLH en orina en el sensor SPR en comparación con las obtenidas en tampón PBST. Las características analíticas del ensayo se recogen en la Tabla 4.4. Los datos muestran que la sensibilidad en orina es bastante similar a la obtenida en PBST para la hFSH y ligeramente mejor para la hLH. Un efecto de matriz explícito, aunque no afecta al funcionamiento del ensayo, es la señal de fondo residual producida por la unión inespecífica de los componentes de la orina.

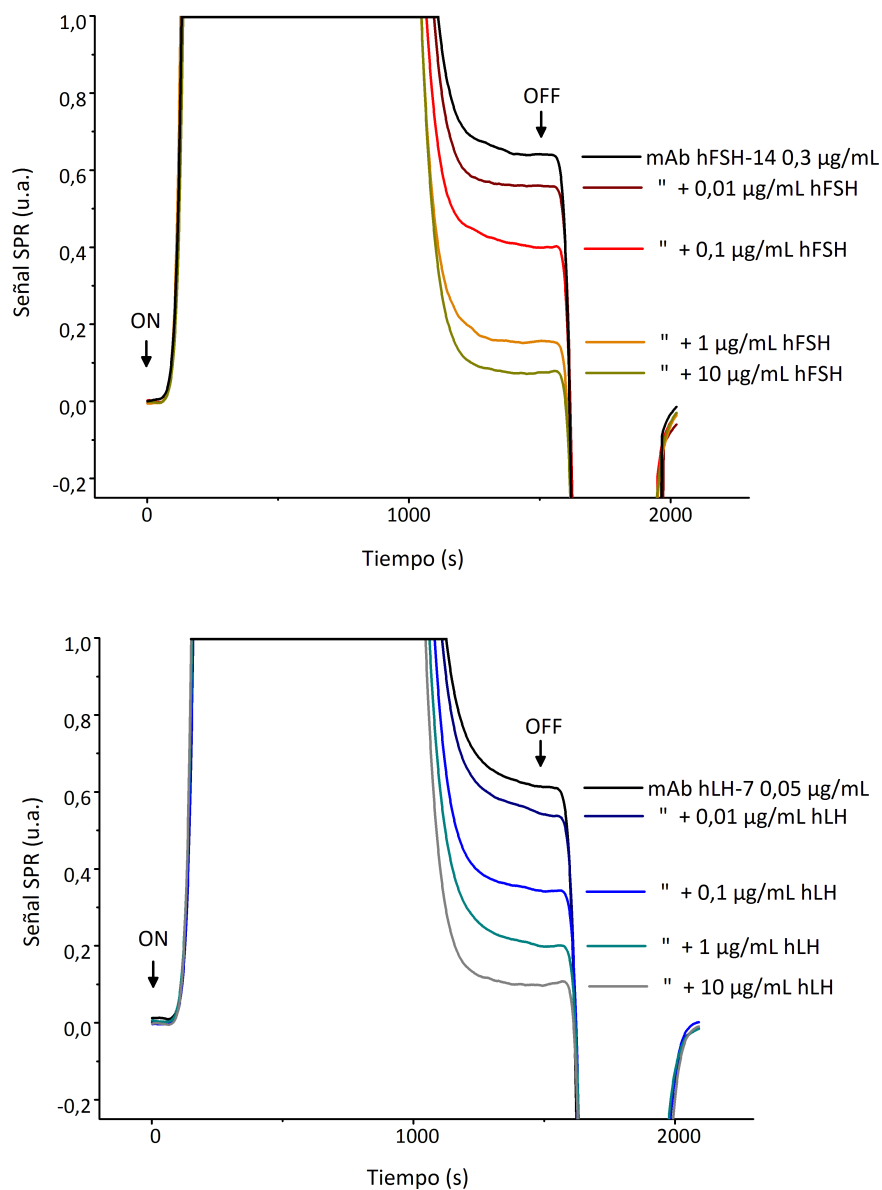


Figura 4.13. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por una concentración constante de anticuerpo específico en presencia de diferentes concentraciones de hormona en orina y los correspondientes ciclos de regeneración.

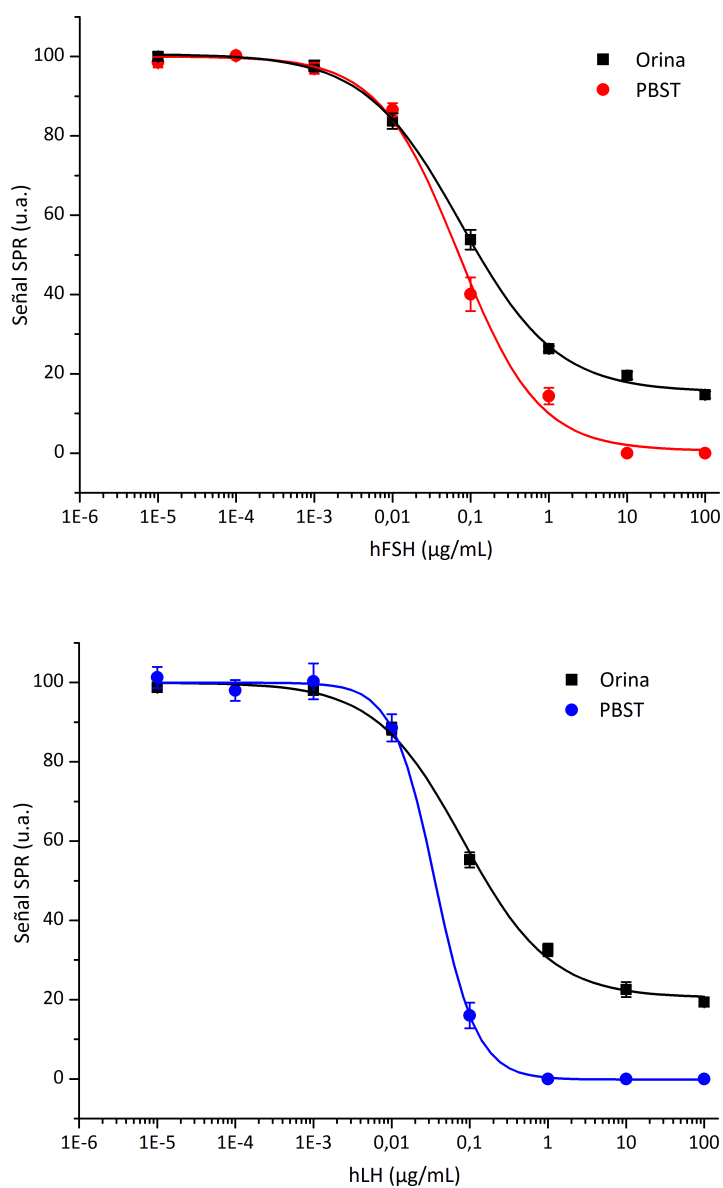


Figura 4.14. Comparación de las curvas de calibrado para hFSH y hLH en PBST y en orina

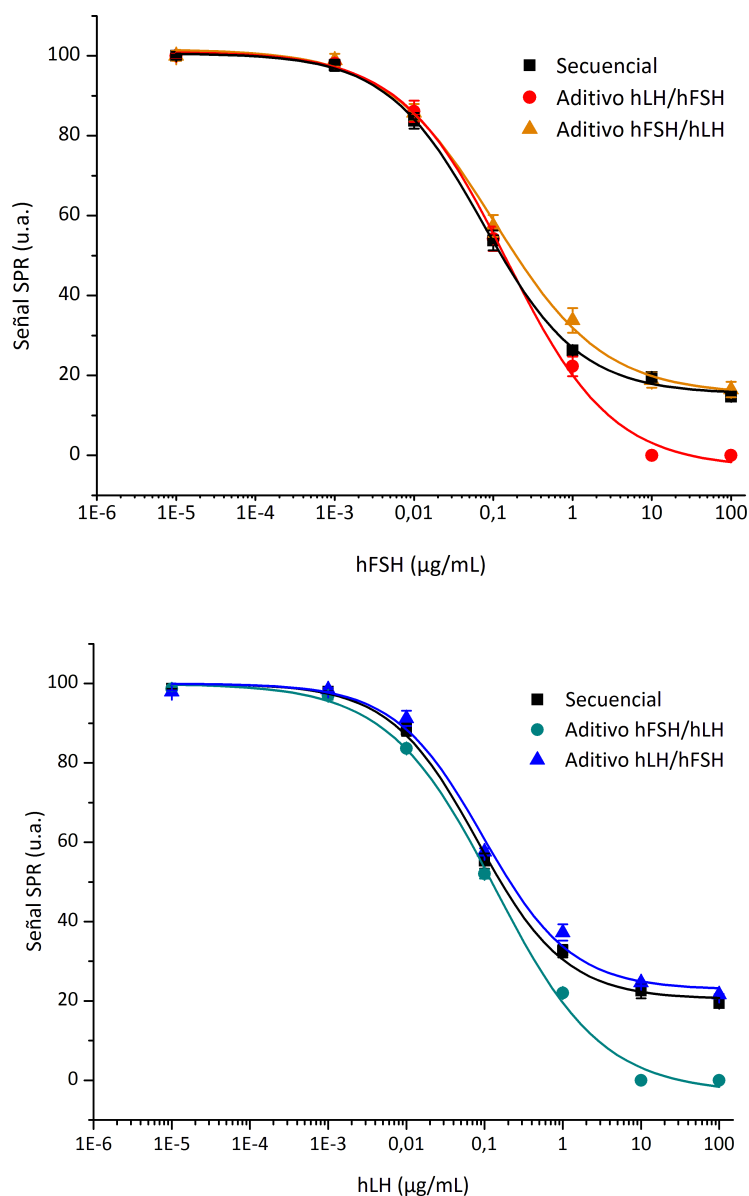


Figura 4.15. Comparación de las curvas de calibrado para hFSH y hLH en orina utilizando diferentes formatos del ensayo multianálito

Se valoró el funcionamiento de las medidas en orina utilizando el formato de inmovilización simultánea siguiendo los protocolos secuencial y aditivo explicados anteriormente. En el protocolo aditivo también se evaluó el efecto del orden de inyección de las muestras. Las curvas de calibrado se muestran en la Figura 4.15 y las

características analíticas del ensayo en la Tabla 4.4. Aunque la sensibilidad del ensayo no se ve afectada en ninguno de los formatos, se observó un efecto debido al orden de inyección en el formato aditivo. Las muestras inyectadas en segundo lugar producen una unión no específica nula, lo que puede ser debido a que los componentes de la orina unidos en la primera inyección bloqueen la superficie, evitando la posterior unión inespecífica en la segunda inyección. Los datos demuestran que la sensibilidad del ensayo es comparable independientemente de la secuencia de inyección de las muestras.

Tabla 4.4. Características analíticas del inmunoensayo SPR para hFSH y hLH utilizando diferentes formatos

hFSH	Secuencial	Aditivo hFSH/hLH	Aditivo hLH/hFSH
LOD (ng mL ⁻¹)	1	2	1
I ₅₀ (ng mL ⁻¹)	77	106	138
Rango lineal (ng mL ⁻¹)	11-546	13-502	18-999
hLH	Secuencial	Aditivo hLH/hFSH	Aditivo hFSH/hLH
LOD (ng mL ⁻¹)	2	3	1
I ₅₀ (ng mL ⁻¹)	85	98	123
Rango lineal (ng mL ⁻¹)	14-546	16-621	14-955

Mediante la utilización del protocolo aditivo el análisis de las dos hormonas se puede llevar a cabo en 50 minutos, lo que reduce el tiempo de análisis en 10 minutos. Al utilizar las dos celdas de flujo del dispositivo, se pueden analizar 4 muestras en 50 minutos, lo que supone una velocidad de procesamiento de 4.8 muestras por hora.

4.3.1. Reproducibilidad

Se estudió la reproducibilidad del ensayo mediante la evaluación de la variabilidad en el día y entre varios días. Se midieron para ello muestras por triplicado de hFSH y hLH a 0.001, 0.01, 0.1 y 1 µg/mL en orina utilizando el formato de inmovilización simultánea y el protocolo aditivo, inyectando las muestras de hLH en primer lugar y las de hFSH en segundo lugar. Éste experimento se repitió en tres días diferentes para evaluar la variabilidad entre días. La Tabla 4.5 muestra los coeficientes de variación entre días y en el día. Todos los valores medios de los coeficientes de

variación interensayo e intraensayo fueron de alrededor del 6% para la hFSH y del 2% para la hLH. Aunque todos los valores se encuentran considerablemente por debajo de los límites normalmente aceptados para los métodos analíticos, podemos observar como la variabilidad en las muestras de hFSH inyectadas en segundo lugar es mayor, por lo que podemos concluir que éste formato de ensayo afecta ligeramente a la reproducibilidad del análisis.

Tabla 4.5. Variaciones intra-ensayo e inter-ensayo para la determinación de muestras triplicadas de hFSH y hLH a lo largo de un periodo de tres días.

	hFSH (µg mL ⁻¹)				Media	hLH (µg mL ⁻¹)				Media
	0.001	0.01	0.1	1		0.001	0.01	0.1	1	
Variación intra-ensayo (R.S.D.%)										
Day 1	0,72	3,03	6,05	16,08	6,47	0,49	2,09	1,52	5,53	2,41
Day 2	1,94	1,53	5,67	15,28	6,11	0,12	1,28	4,96	3,15	2,38
Day 3	0,32	3,68	4,51	15,16	5,92	0,75	1,82	1,27	2,57	1,60
Variación inter-ensayo (R.S.D.%)										
3-Day period	1,58	1,95	3,73	18,51	6,44	0,68	1,72	1,83	4,34	2,14

También se evaluó el efecto del uso de diferentes superficies sensoras sobre la reproducibilidad del ensayo. Se midieron curvas de calibrado por triplicado en idénticas condiciones utilizando tres superficies sensoras preparadas en un espacio de 4 meses. La Figura 4.16 muestra la comparación de éstas curvas de calibrado para las tres superficies comprobadas. La reproducibilidad entre diferentes sensores resultó ser excelente, mostrando coeficientes de variación de 4.2% y 3.7% para la hFSH y la hLH respectivamente.

4.3.1. Reutilización

Tanto en el caso del inmunoensayo de hFSH como para el de hLH e independientemente del formato de análisis utilizado, se logró la completa regeneración de la superficie mediante una disolución de HCl 5 mM. Se comprobó la estabilidad del inmunosensor utilizando estas condiciones de regeneración. Con este propósito se midieron las variaciones de la respuesta específica SPR a través de una serie de ciclos

de análisis. Este estudio se llevó a cabo utilizando el formato de inmovilización simultánea y combinando los protocolos secuencial y aditivo.

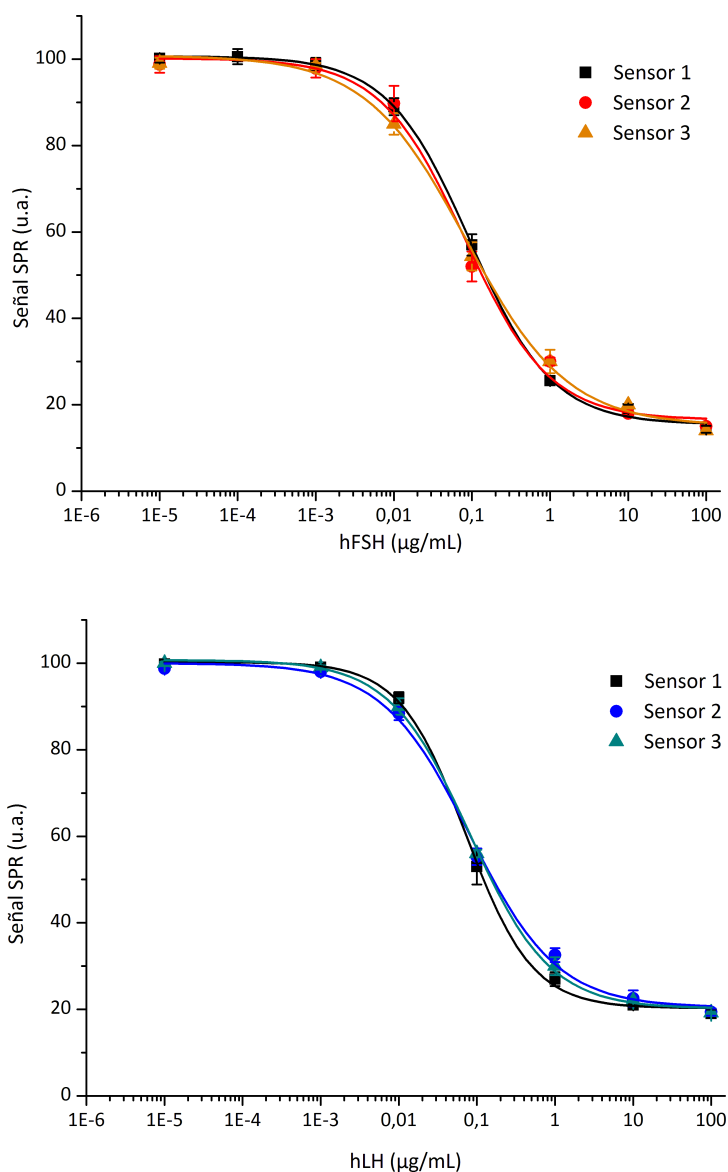


Figura 4.16. Comparación de las curvas de calibrado para hFSH y hLH en orina obtenidas utilizando diferentes superficies sensoras

El formato aditivo reduce el número de ciclos de regeneración, disminuyendo consecuentemente el riesgo de afectar a la estabilidad del sensor. La respuesta del sensor permaneció estable por un periodo de 6 días de funcionamiento continuo, lo que

permitió su uso, con una pérdida máxima de señal del 13% del valor inicial, durante más de 100 medidas y 60 ciclos de regeneración en cada una de las celdas del dispositivo. En la Fig 4.17 se muestran los sensogramas correspondientes a algunas medidas representativas llevadas a cabo en ese periodo.

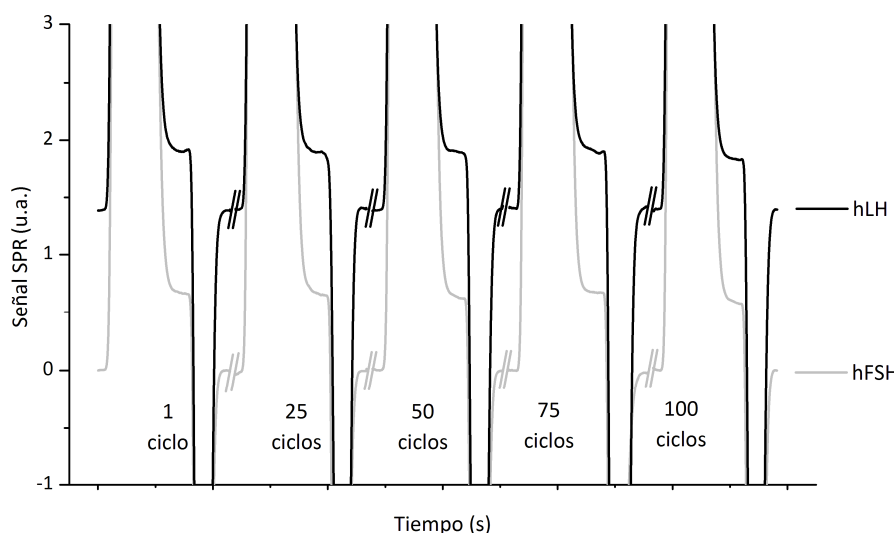


Figura 4.17. Evolución de la señal SPR de los anticuerpos a lo largo de los ciclos de medida y regeneración en muestras de orina.

La reutilización del sensor de hFSH y hLH para la medida de muestras de orina es muy similar a la que hemos observado al medir la hGH en tampón PBST y es notablemente mejor que la correspondiente a las medidas de hGH en muestras de suero. En la Figura 4.18 podemos observar la comparación de las señales de los anticuerpos en las diferentes matrices de muestra. Estas ligeras variaciones en la señal no tienen consecuencias en la reproducibilidad del ensayo, ya que todas las medidas se normalizaron respecto a la señal SPR máxima producida por el anticuerpo.

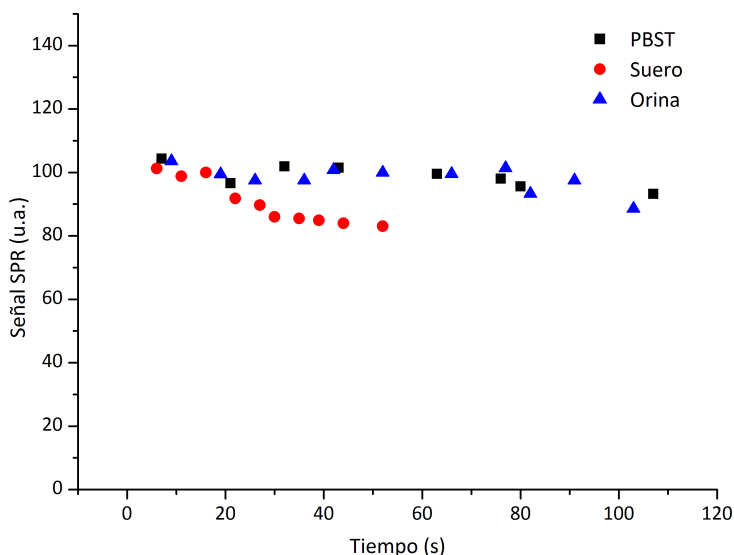


Figura 4.18. Comparación de la estabilidad de la señal SPR del anticuerpo en las diferentes matrices analizadas.

4.4. Conclusiones

Este trabajo muestra el funcionamiento del inmunosensor SPR para la determinación multianalito de las hormonas gonadotrópicas hFSH y hLH. La determinación multianalito se llevó a cabo mediante los procedimientos de inmovilización individual o simultánea de las hormonas. Por medio de una inmovilización simultánea, las determinaciones se llevaron a cabo mediante los procedimientos secuencial y aditivo, mostrando ambos formatos sensibilidades muy similares.

La sensibilidad del inmunoensayo SPR permite la detección multianalito de estas hormonas en orina a niveles de concentración tan bajos como 1 ng/mL (28 pM de hFSH y 35 pM de hLH). Haciendo uso de las unidades internacionales en referencia a los estándares de la WHO, estos LODs equivalen a 8 mIU/mL de hLH y 14 mIU/mL de hFSH. Estos niveles de sensibilidad se encuentran dentro de los niveles fisiológicos basales. La detección de incrementos en las concentraciones de éstas hormonas

mediante este método es de utilidad para la determinación del periodo fértil, de la llegada de la menopausia y en el diagnóstico de enfermedades como el síndrome del ovario poliquístico y otras disfunciones gonadales. El inmunoensayo SPR proporciona un método rápido, en tiempo real y sin necesidad de marcadores, para la determinación de estas hormonas de forma directa y sin ningún tipo de pretratamiento en un reducido volumen de muestra. La fiabilidad del ensayo quedó demostrada por su excelente reproducibilidad y estabilidad.

4.5. Referencias

1. Stanton, P.G., et al., *Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms*. Molecular and Cellular Endocrinology, 1996. **125**(1-2): p. 133-141.
2. Gonzalez-Martinez, M.A., R. Puchades, and A. Maquieira, *Comparison of Multianalyte Immunosensor Formats for On-Line Determination of Organic Compounds*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(17): p. 4326-4332.
3. Mauriz, E., et al., *Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(4): p. 1449-58.
4. Thongboonkerd, V., *Practical points in urinary proteomics*. Journal of Proteome Research, 2007. **6**(10): p. 3881-3890.
5. Tirumalai, R.S., et al., *Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome**. S. Molecular & Cellular Proteomics, 2003. **2**(10): p. 1096-1103.
6. Harper, R.G., et al., *Low-molecular-weight human serum proteome using ultrafiltration, isoelectric focusing, and mass spectrometry*. Electrophoresis, 2004. **25**(9): p. 1299-306.

5. Inmunoensayo SPR para la determinación de la hormona hTSH

5.1. Inmovilización de la hTSH

Se eligió un formato de inmunoensayo de inhibición para la determinación de hTSH por las mismas razones expuestas para el resto de los ensayos anteriores. La inmovilización se llevó a cabo igualmente mediante la formación de una SAM de MUA sobre la superficie de oro y el posterior acoplamiento con los grupos amino de la proteína. Previamente se exploró el pH óptimo para llevar a cabo la inmovilización. Las señales obtenidas al inyectar disoluciones de hTSH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en pH comprendidos entre 3.5 y 8 en el sensor modificado con la SAM de MUA sin activar se muestran en la Figura 5.1.

Las señales SPR debidas a la adsorción de la hTSH sobre la superficie del sensor son coherentes con el mecanismo explicado en el punto 3.1, y con el punto isoelectrico de la hTSH. Como ocurre en el caso de la hFSH y hLH, la hTSH presenta

también isoformas con diferentes puntos isoelectricos, en este caso entre 6.0 – 8.6 [1], por lo que su adsorción se produce en un rango de pH bastante amplio, siendo máxima a un pH de 5.5. En consecuencia, se inmovilizó las hTSH utilizando un tampón con 10 mM de acetato a pH 5.5. Se eligió una concentración de inmovilización de 25 µg/mL, ya que es suficiente para alcanzar el nivel máximo de inmovilización.

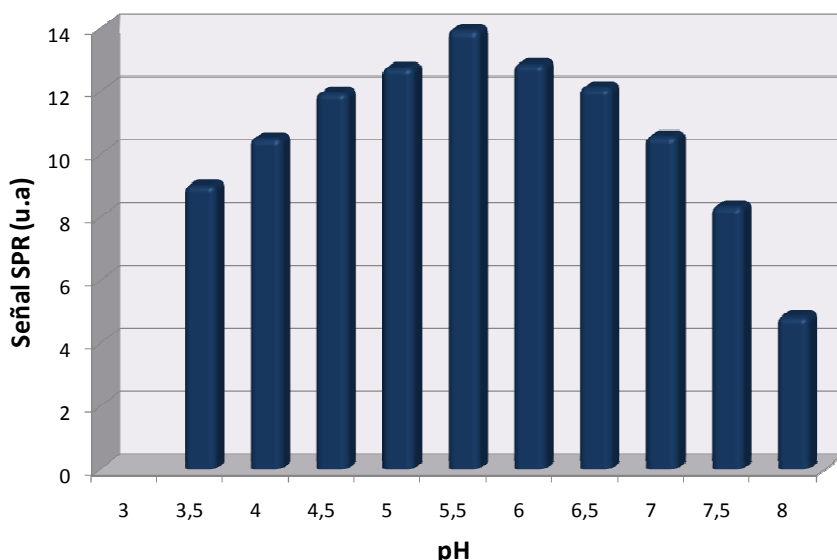


Figura 5.1. Representación de las señales SPR producidas por la adsorción de hTSH sobre la superficie sin activar utilizando disoluciones de diferentes pHs

En la Figura 5.2 se presenta un sensograma en tiempo real de la inmovilización de la hTSH en las dos celdas de flujo. En primer lugar se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó la disolución de hTSH, produciéndose un incremento en la señal SPR debido a su inmovilización. Se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina. Finalmente, nos aseguramos de que todas las moléculas que permanezcan en la superficie estén unidas covalentemente mediante la inyección de una disolución de HCl 100 mM, desprendiendo todas las moléculas adsorbidas físicamente. El incremento de señal SPR respecto al inicio de la inmovilización nos da una idea de la cantidad de hormona inmovilizada, aunque es la

señal producida por la unión del anticuerpo específico la que nos proporciona información de la funcionalidad de la capa formada.

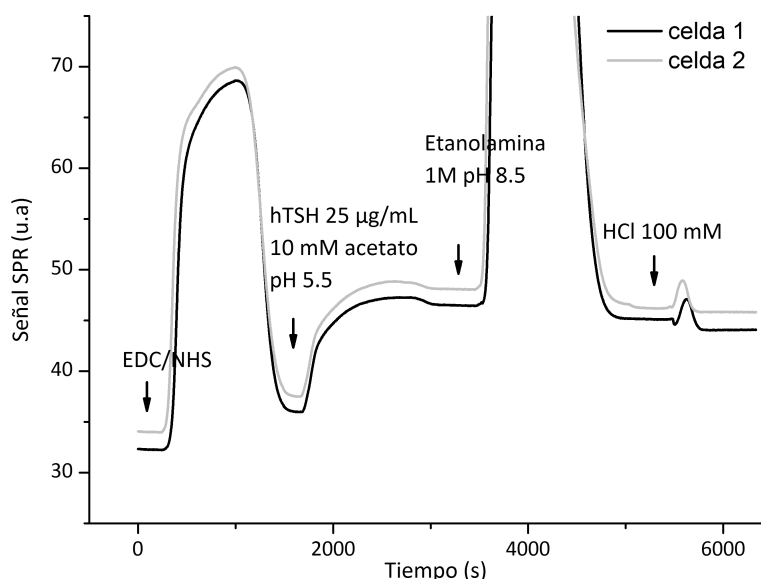


Figura 5.2. Sensograma del proceso de inmovilización de la hTSH en las dos celdas de flujo del sensor SPR.

5.2. Inmunoensayo SPR para la determinación de hTSH en PBST

5.2.1. Selección de anticuerpos

En primer lugar se caracterizó el inmunoensayo SPR para la detección de hTSH en tampón PBST. Se probaron los anticuerpos disponibles para la TSH (Tabla 2.1) en su sensor correspondiente para comprobar su capacidad para la unión a la hormona inmovilizada. Los anticuerpos hTSH-1, hTSH-2 y hTSH-3 fueron seleccionados debido a que todos proporcionan una aceptable señal SPR, como puede observarse en la Figura 5.3.

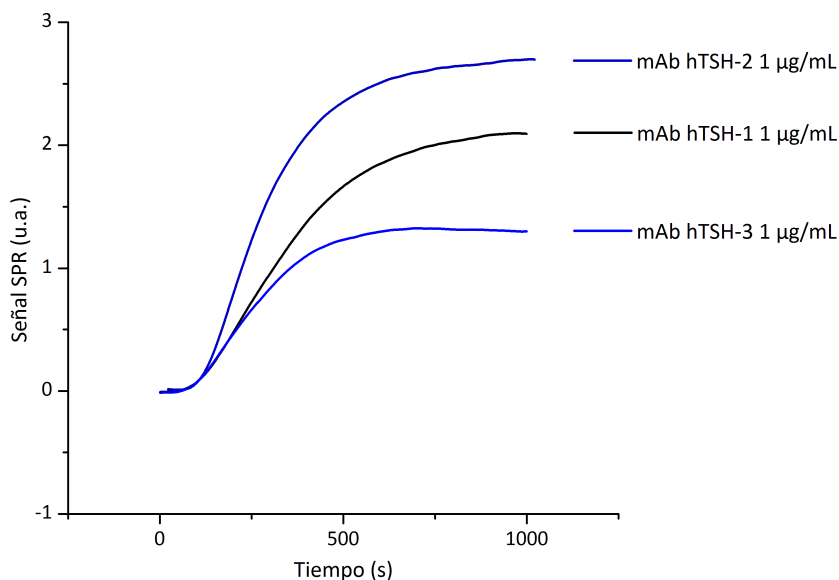


Figura 5.3. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por los diferentes anticuerpos específicos de la hTSH.

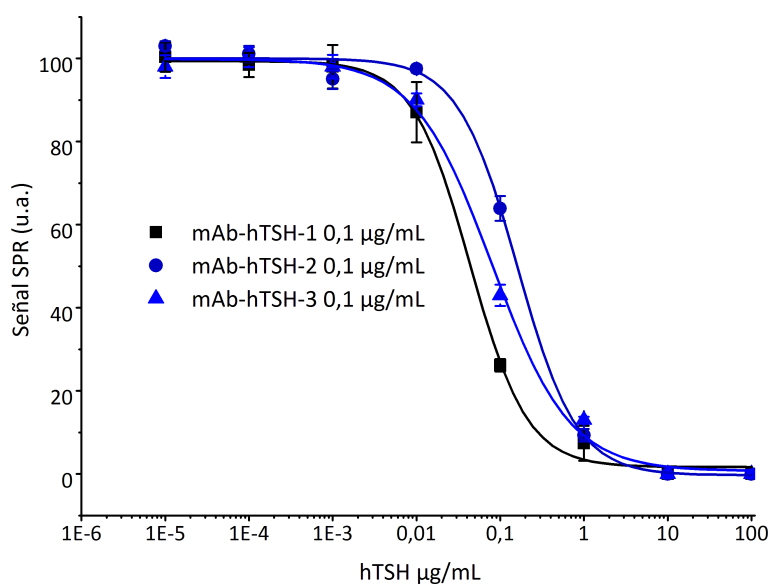


Figura 5.4. Comparación de las curvas de calibrado para la determinación de hTSH obtenidas utilizando diferentes anticuerpos

Seguidamente se optimizó la concentración de anticuerpo para llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición, ya que, como hemos comentado en el punto 3.2, éste parámetro tiene una gran influencia en las características del inmunoensayo. Se probaron concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de los anticuerpos hTSH-1, hTSH-2 y hTSH-3. En todos los casos, una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ resultó suficiente para proporcionar una señal SPR adecuada para llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición. Estos anticuerpos se examinaron para elegir los que producen la mejor sensibilidad del ensayo. Para ello se midieron curvas de calibrado utilizando 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de hTSH-1, hTSH-2 y hTSH-3. Las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la Figura 5.4. Se eligieron los anticuerpos hTSH-1 y hTSH-3 debido a las características analíticas de los ensayos, mostradas en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Características analíticas del inmunoensayo SPR para hTSH utilizando diferentes anticuerpos

Características analíticas	hTSH		
	mAb-hTSH-1	mAb-hTSH-2	mAb-hTSH-3
LOD (ng mL^{-1})	4	15	3
I_{50} (ng mL^{-1})	44	159	81
Rango de lineal (ng mL^{-1})	14-138	51-488	18-367

En la Figura 5.5 se pueden observar las señales SPR producidas por disoluciones con una concentración constante de anticuerpo hTSH-1 en presencia de concentraciones crecientes de hTSH. Al final de cada ciclo de medida se disoció la unión mediante la inyección de una disolución de regeneración de HCl 5 mM, lo que quedó demostrado por la disminución de la señal SPR hasta el nivel anterior a la asociación, quedando preparada la superficie para el siguiente ciclo de medida.

Posteriormente, se probó el funcionamiento de los anticuerpos seccionados, hTSH-1 y hTSH-3 en el tampón PBST-S. Para ello se midieron curvas de calibrado (Fig 5.6) utilizando hTSH-1 y hTSH-3 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S. Podemos observar que la sensibilidad del ensayo utilizando PBST-S es mejor en el caso del anticuerpo hTSH-1, mientras que empeora para el hTSH-3 respecto a los datos obtenidos en PBST (Tabla

5.1). Debido a esto se seleccionó el anticuerpo hTSH-1 para llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición de hTSH en muestras reales.

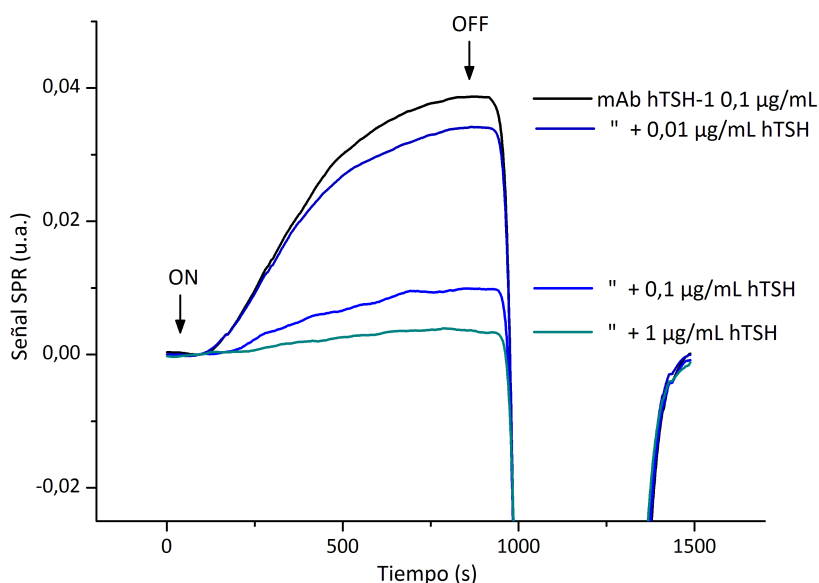


Figura 5.5. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por una concentración constante del anticuerpo en presencia de diferentes concentraciones de hormona y los correspondientes ciclos de regeneración.

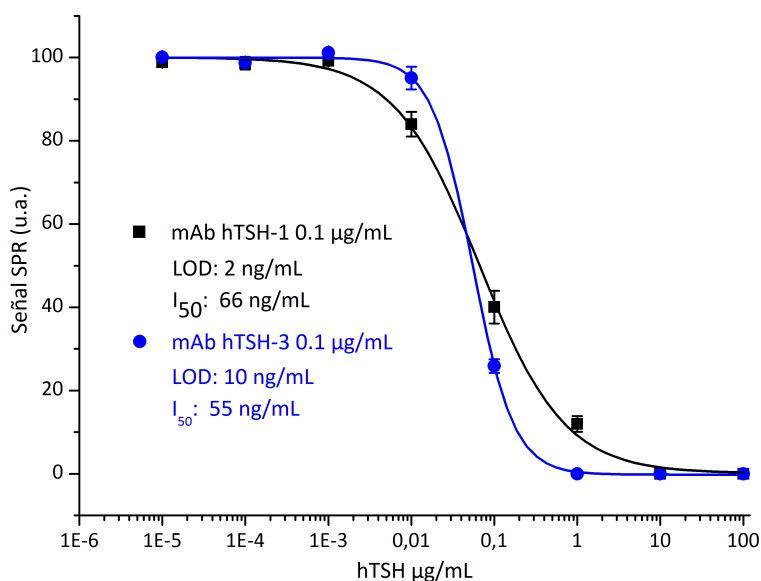


Figura 5.6. Curvas de calibrado correspondientes a los anticuerpos hTSH-1 y hTSH-3 en el tampón PBST-S

Se evaluó la especificidad del sensor mediante la inyección de los anticuerpos específicos del resto de las hormonas, hFSH-14, hLH-7 y hGH-12 a 1 $\mu\text{g/mL}$. Para ello se fluyeron disoluciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ de los anticuerpos hFSH-14, hLH-7 y hGH-12 en el sensor de hTSH utilizando las mismas condiciones experimentales. La especificidad del sensor quedó demostrada por la nula señal SPR producida en todos los casos, como se muestra en la Figura 5.7.

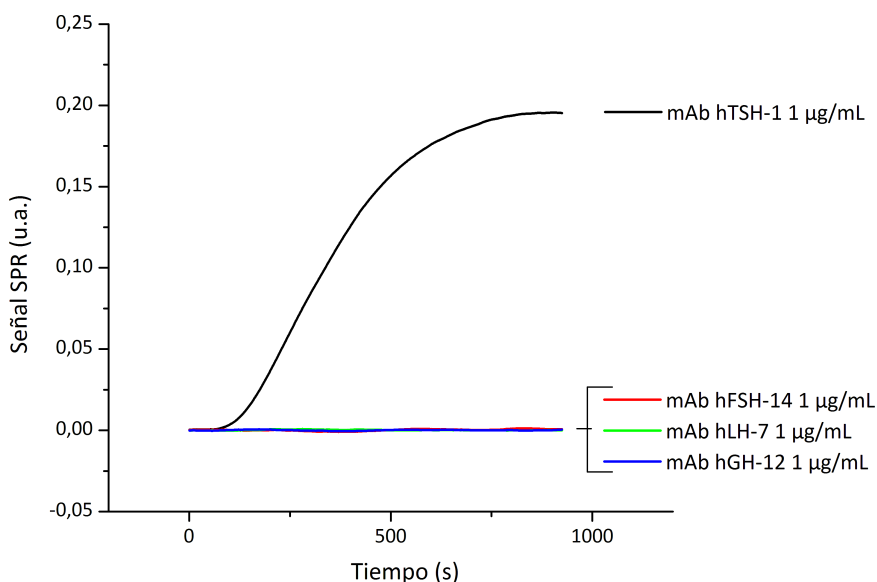


Figura 5.7. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por el anticuerpo específico de la hTSH y los anticuerpos inespecíficos en el sensor de hTSH.

También se comprobó la reactividad cruzada del anticuerpo inyectando mezclas del anticuerpo específico hTSH-1 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ con los analitos no específicos hFSH, hLH y hGH a 10 $\mu\text{g/mL}$ en el sensor de hTSH. En todos los casos, la señal SPR de los anticuerpos no se vio afectada por la presencia de estos analitos, como puede observarse en la Figura 5.8. La presencia de éstos analitos no tiene ningún efecto sobre la señal producida por la interacción específica, lo que demostró que el formato de análisis es suficientemente selectivo para no reconocer el resto de analitos presentes en la disolución, permitiendo así llevar a cabo la detección de estas sustancias en muestras complejas que contengan más de una de estas hormonas.

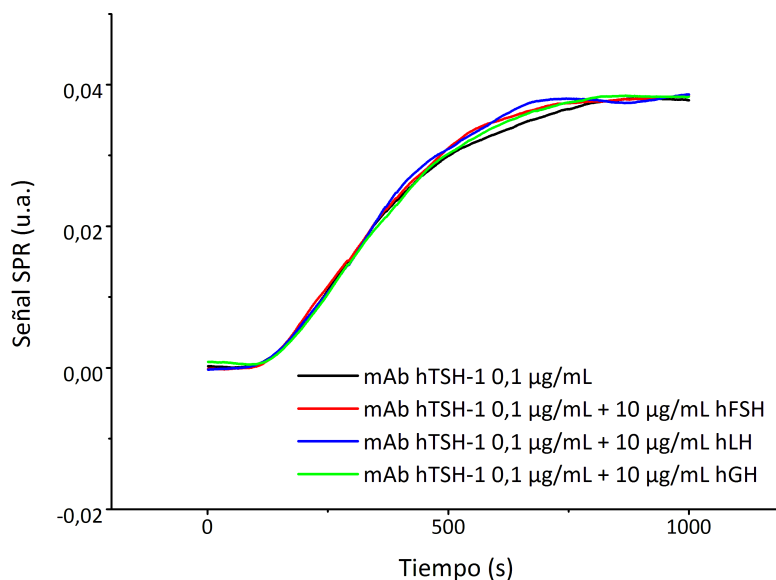


Figura 5.8. Sensogramas correspondientes a las señales SPR producidas por el anticuerpo específico de la hTSH en presencia de las demás hormonas pituitarias

Este inmunoensayo SPR permite llevar a cabo la determinación de hTSH de forma sencilla y rápida, en 25 minutos por cada ciclo de medida y regeneración. El ensayo de hTSH presenta un límite de detección de 2 ng/mL, que referido a los estándares internacionales corresponde a 15 μ IU/mL. Este límite de detección se encuentra en un orden de concentración adecuado para el diagnóstico del hipotiroidismo congénito. Una vez establecidos los parámetros del proceso de inmovilización y del inmunoensayo en disolución tampón, se pasó a investigar las condiciones necesarias para poder llevar a cabo la determinación de la hormona en muestras reales.

5.3. Inmunoensayo SPR para la determinación de hTSH en muestras reales

Una de las principales aplicaciones de la determinación de hTSH es el diagnóstico de hipotiroidismo congénito en recién nacidos, que se realiza en muchos países dentro de programas de cribado neonatal. Esta medida se efectúa en muestras de

sangre obtenidas mediante una punción en el talón, depositadas sobre papel de filtro y secadas. Los pacientes con valores de hTSH $> 20 \mu\text{IU/mL}$ en los primeros 2 – 4 días de vida se vuelven a analizar para confirmar el diagnóstico y comenzar el tratamiento [2].

En primer lugar se comprobó la unión inespecífica de los componentes de la matriz de la muestra sobre la superficie del sensor SPR. Para ello se analizaron estándares de control sin hTSH. Se cortaron discos de 4.5 mm de diámetro de cada muestra, se introdujeron en 200 μL de tampón PBST o de tampón PBST-S durante toda la noche con agitación suave. Posteriormente se centrifugaron las disoluciones 5 minutos a 3000 rpm, y se tomaron 110 μL de sobrenadante. Estos extractos se mezclaron (1:1) con el tampón correspondiente para reproducir las condiciones del ensayo de inhibición. La Figura 5.9 muestra como la señal SPR producida por la unión inespecífica de los componentes de la matriz de la muestra se ve reducida en un 95 % usando PBST-S respecto a la señal obtenida usando PBST. Si comparamos éstos resultados con lo obtenidos al medir muestras de suero, podemos observar como, debido a que en el proceso de extracción la sangre se diluye en el tampón, la unión inespecífica producida es mucho menor, suponiendo un 88 % menos que en el caso del suero al trabajar en tampón PBST y un 95 % menor al trabajar en tampón PBST-S.

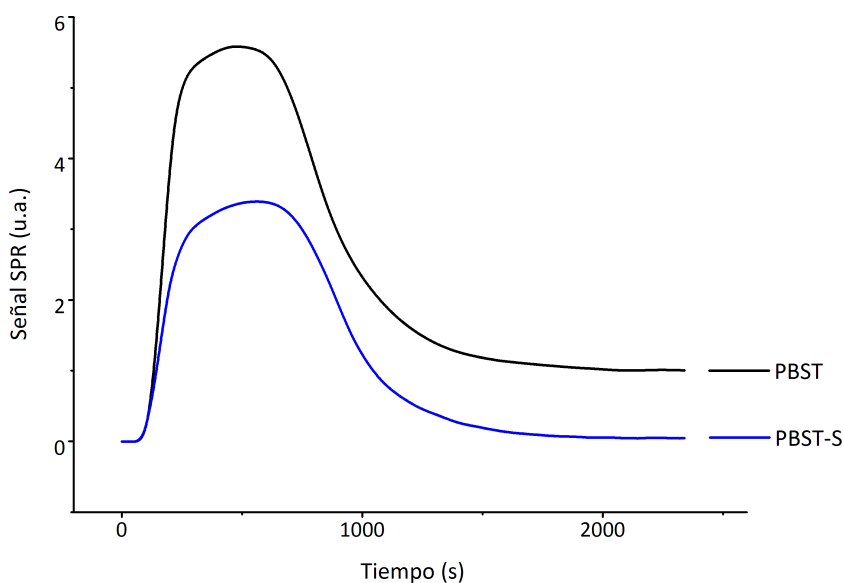


Figura 5.9. Comparación de los sensogramas producidos por las muestras de sangre extraídas utilizando diferentes tampones de ensayo

Seguidamente se comprobó la señal específica producida por el anticuerpo al mezclarse con la matriz de la muestra. Para ello se analizaron estándares de control sin hTSH que se extrajeron en tampón PBST-S. Los extractos se mezclaron (1:1) con el anticuerpo hTSH-1 a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 5.10 se muestra la señal producida por ésta muestra en comparación con la señal de fondo correspondiente a la unión inespecífica. Ésta señal inespecífica supone tan solo alrededor de un 10% de la señal específica producida por el anticuerpo, lo que podría permitir llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición utilizando este tipo de muestras.

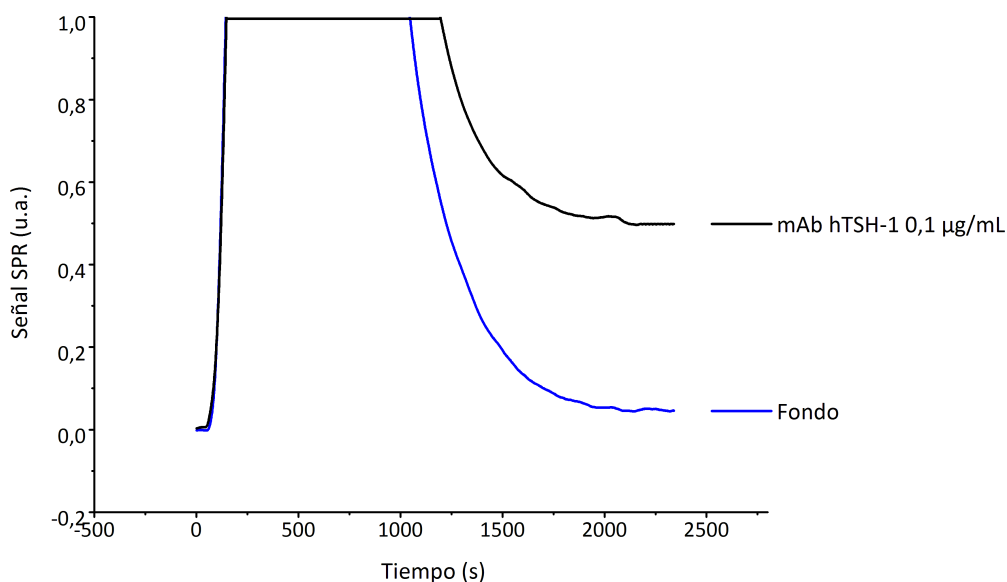


Figura 5.10. Comparación de los sensogramas producidos por la señal específica y la señal inespecífica al medir muestras de sangre extraídas utilizando PBST-S como tampón de ensayo

Una vez establecidas las condiciones del ensayo, se midieron estándares de calibración en el rango de 1 – 240 $\mu\text{IU/mL}$ y estándares de control. La Figura 5.11 muestra las señales SPR producidas por las mezclas del anticuerpo hTSH-1 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S con los extractos del estándar de control negativo y el estándar de mayor concentración, 240 $\mu\text{IU/mL}$. La regeneración de la superficie tras cada medida se llevó a cabo utilizando una disolución de HCl 5mM. El estándar de mayor concentración, 240 $\mu\text{IU/mL}$, equivale a 32 ng/mL. Este estándar, utilizando la curva de calibrado obtenida con el anticuerpo hTSH-1 a 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en PBST-S (Fig 5.6) debería

producir una inhibición de aproximadamente el 35 % respecto a la señal del control negativo. Pero, como podemos observar, la señal SPR no se ve reducida al aumentar la concentración de analito en la muestra, lo que indica que no se produce inhibición en el rango de concentraciones del trabajo.

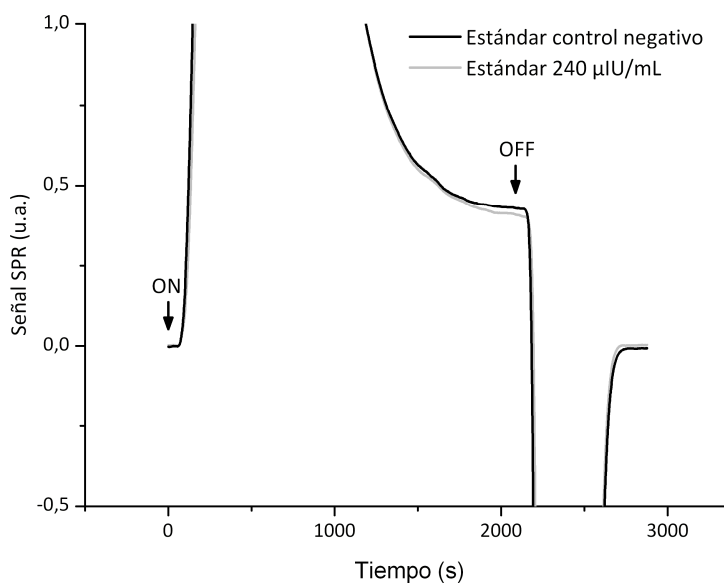


Figura 5.11. Comparación de los sensogramas producidos en la medida de extractos de estándares de hTSH en sangre.

Para comprobar el efecto del tratamiento de la muestra, se prepararon disoluciones de hTSH en el intervalo de 10^{-3} a $100 \mu\text{g/mL}$ en PBST y se depositaron $25 \mu\text{L}$ de cada una sobre el papel de filtro utilizado para la recogida de muestra. Una vez que las manchas se secaron, se prepararon las muestras siguiendo el protocolo anterior y se midieron en el sensor SPR. La Figura 5.12 muestra la curva de calibrado obtenida con estas muestras preparadas en papel de filtro en comparación con la curva de calibrado obtenida anteriormente con disoluciones de calibración preparadas en tampón PBST-S. Podemos observar como el proceso de preparación de la muestra hace que la curva se desplace de un I_{50} de 66 ng/mL a 6387 ng/mL . El desplazamiento se explica por la dilución de la muestra que se produce en el tratamiento. Siguiendo el protocolo establecido para el tratamiento de las muestras, se deposita una gota aproximada de $25 \mu\text{L}$, que produce una mancha alrededor de 15 mm de diámetro, de la que hay que cortar

un disco de 4.5 mm de diámetro, lo que supone una onceava parte del total de la gota de sangre depositada en el filtro. Posteriormente se extrae la muestra usando 200 μL de disolución tampón por lo que la dilución total es de aproximadamente 90 veces.

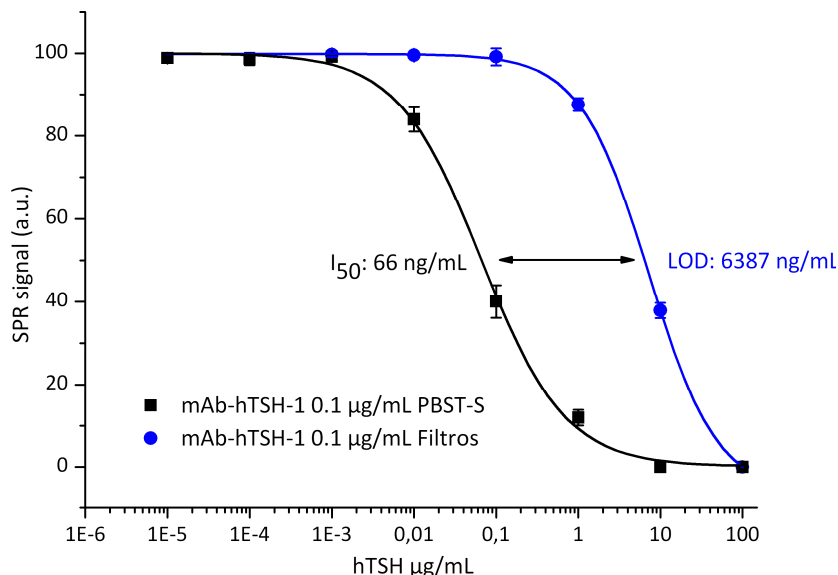


Figura 5.12. Curvas de calibrado para la determinación de hTSH correspondientes a los estándares preparados en tampón o en papel de filtro

Aunque la sensibilidad del inmunoensayo SPR es la adecuada y el problema de la unión inespecífica de los componentes de la matriz queda bastante reducido, la medida de hTSH en este tipo de muestras presenta un problema derivado del propio sistema de muestreo. Debido a la dilución de la muestra durante el tratamiento, no es posible determinar la hTSH en los niveles de concentración deseados.

5.4. Conclusiones

El ensayo para la determinación de hTSH alcanza un límite de detección de 2 ng/mL (80 pM), lo que en unidades internacionales referidas a los estándares de la WHO suponen 15 $\mu\text{IU/mL}$. Aunque la sensibilidad de este ensayo es comparable a la obtenida en los inmunoensayos para la determinación del resto de hormonas estudiadas en este trabajo, los niveles de concentración basales en el caso de la hTSH son más

bajos (0.4 - 4 $\mu\text{IU/mL}$). Por otro lado, el límite de detección se encuentra por debajo del nivel de corte para el diagnóstico del hipotiroidismo congénito (20 $\mu\text{IU/mL}$), por lo que el método se puede considerar de utilidad para esta aplicación.

Los inconvenientes mencionados a la hora de trabajar con muestras reales podrían solucionarse obteniendo muestras de sangre o suero directamente, ya que podrían llevarse a cabo las medidas de forma análoga a las de la hGH. Aunque el muestreo en papel de filtro está sólidamente establecido para el cribado neonatal, podría obtenerse fácilmente, por el mismo método de punción en el talón, una muestra que sirva para el análisis en el sensor SPR.

La aplicación del inmunoensayo SPR supondría la posibilidad de llevar a cabo una medida rápida, simple y en tiempo real ahorrando los pasos de tratamiento de la muestra, lo que permitiría obtener los resultados en unos minutos y sin necesidad de personal cualificado. La portabilidad del dispositivo permitiría realizar medidas en el lugar de atención al paciente e incluso en campañas de cribado en zonas en las que no se dispone de los medios adecuados para trabajar con las técnicas convencionales. En estos lugares, la posibilidad de efectuar éstos análisis más cerca del paciente y obtener los resultados en el mismo momento podría tener un gran impacto en el tratamiento de los recién nacidos.

5.5. Referencias

1. Sergi, I., et al., *Immunoreactive and bioactive isoforms of human thyrotropin*. Endocrinology, 1991. **128**(6): p. 3259-3268.
2. Rose, S.R., et al., *Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism*. Pediatrics, 2006. **117**(6): p. 2290-2303.

6. Estudio de estrategias para la inmovilización de anticuerpos en el biosensor SPR

Como ya se ha comentado en los capítulos anteriores, la problemática de la inmovilización de los anticuerpos nos ha llevado, en primera instancia, a escoger un formato de inmunoensayo de inhibición con el antígeno inmovilizado en la superficie para la determinación de las hormonas de origen pituitario. Paralelamente, se ha intentado estudiar en profundidad el proceso de funcionalización de la superficie del sensor SPR con anticuerpos con el fin de posibilitar la realización de inmunoensayos directos o de tipo sándwich.

En general, las superficies funcionalizadas con anticuerpos muestran bajos rendimientos debido a la pérdida de actividad asociada a su inmovilización [1]. El proceso de inmovilización puede afectar a la actividad debido a causas como la modificación química de la zona de unión al antígeno, el impedimento estérico debido a

una densidad superficial inadecuada y la posible desnaturalización por causa de la tensión creada por la unión a la superficie por varios puntos de la molécula simultáneamente [2]. Debido a éstas razones, para lograr una inmovilización funcional, es necesario alcanzar una densidad adecuada de los anticuerpos en la superficie y conseguir que se dispongan en una orientación adecuada, que permita que los sitios de reconocimiento antigénico presentes en la molécula se encuentren accesibles. De esta manera se puede alcanzar unas condiciones de inmovilización óptimas que produzcan una mayor proporción superficial de moléculas activas.

En este trabajo hemos intentado estudiar el efecto de diferentes factores en el proceso de inmovilización de los anticuerpos:

- Por un lado, se ha procurado alcanzar la densidad superficial más adecuada, que permita mantener la máxima actividad de los anticuerpos inmovilizados. Para este propósito se han empleado SAMs mixtas formadas por un alcanotiol funcionalizado, para la inmovilización del anticuerpo, junto con otro alcanotiol separador, que no cuenta con un grupo funcional reactivo. De esta manera, mediante la variación de la proporción de estos dos alcanotioles en la formación de la SAM, se puede alcanzar una densidad óptima de puntos de unión para los anticuerpos en la superficie.
- Al mismo tiempo, se han ensayado diferentes estrategias para la unión del anticuerpo en la superficie del sensor funcionalizado con SAMs:
 - Inicialmente se ha probado la inmovilización directa de los anticuerpos mediante enlace covalente con los grupos terminales de la SAM. En este formato se han intentado dos métodos alternativos que tienen como objetivo diferentes zonas de la molécula de anticuerpo para elegir el que proporciona una orientación más apropiada y por lo tanto una mayor funcionalidad.
 - Posteriormente se ha comprobado la posibilidad de inmovilizar los anticuerpos mediante el uso de un método de captura a través de una interacción de elevada afinidad, haciendo uso del sistema estreptavidina-biotina. Dentro de ésta línea de trabajo se han ensayado dos métodos diferentes para inmovilizar la estreptavidina, que actúa como molécula intermedia. También se han probado dos métodos alternativos de marcaje con

biotina que se dirigen a zonas diferentes de la molécula de anticuerpo, para elegir el que proporciona una mejor orientación y funcionalidad.

6.1. Inmovilización covalente

Para llevar a cabo la inmovilización covalente de los anticuerpos se usaron dos estrategias diferentes. La primera es la inmovilización por medio del acoplamiento mediante los grupos amino que se ha explicado en el punto 3.1. Posteriormente se utilizó también el acoplamiento mediante las funciones carbohidrato presentes en los anticuerpos.

Se utilizaron diferentes superficies sensoras en las que se formaron SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH utilizando disoluciones con fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1, 0.05, 0.033, 0.02, 0.013 y 0.01. Sobre estas SAMs se llevó a cabo el acoplamiento mediante los grupos amino del anticuerpo hGH-12. Según se puede observar en la Figura 6.1, en primer lugar, se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó la disolución de anticuerpo hGH-12, produciéndose un incremento en la señal SPR debida a su inmovilización. Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina 1M a pH 8.5. El incremento de señal SPR respecto al inicio de la inmovilización nos da una idea de la cantidad de anticuerpo hGH-12 inmovilizado, aunque es la señal producida por la unión del antígeno la que nos proporciona información de la funcionalidad de la capa formada. Una vez llevada a cabo la inmovilización se hizo esta comprobación, sin que se observara ninguna señal debido a la interacción de la hGH con el anticuerpo inmovilizado en ninguna de las superficies utilizadas.

Aunque se produce un incremento de la señal SPR análogo al que se obtiene para la inmovilización de otras proteínas, lo que indica que el anticuerpo se está inmovilizando sobre la superficie, ésta inmovilización no es funcional. La inmovilización del anticuerpo podría producir la alteración de su funcionamiento. El hecho de que la inmovilización mediante los grupos amino puede dirigirse a cualquier

zona de la estructura del anticuerpo puede hacer que no se produzca una orientación adecuada [1].

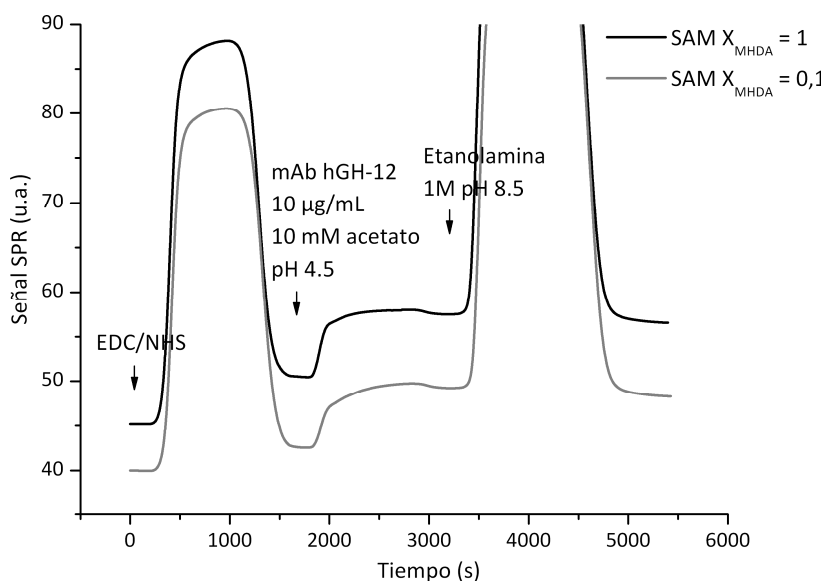


Figura 6.1. Sensogramas representativos del proceso de inmovilización covalente del anticuerpo hGH-12 sobre superficies funcionalizadas con SAMs de diferente composición

Debido a esto se intentó la inmovilización del anticuerpo por medio de los grupos carbohidrato localizados en su fragmento Fc (Fig 1.5). Este tipo de inmovilización (Fig 6.2) implica la oxidación suave de estos grupos para generar grupos aldehído, que pueden condensarse con nucleófilos como aminas o hidracidas [3]. La oxidación del anticuerpo se consigue con metaperiodato sódico (NaIO_4) 2 mM en tampón PBS durante 30 minutos a 4 °C y protegiendo de la luz. Para la obtención de una SAM terminada en grupos hidracida, se activa la superficie de la SAM carboxilada con EDC y NHS en las mismas condiciones utilizadas en el acoplamiento amino y posteriormente se trata con hidracina. La posterior reacción de estos grupos hidracida con los grupos aldehído generados en el anticuerpo produce un enlace de tipo hidrazona.

En este caso también se utilizaron superficies sensoras con SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH formadas utilizando disoluciones con fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1, 0.05, 0.033, 0.02, 0.013 y 0.01 cuyos grupos carboxilo se

funcionalizaron con hidracina y posteriormente se hicieron reaccionar con el anticuerpo hGH-12 oxidado.

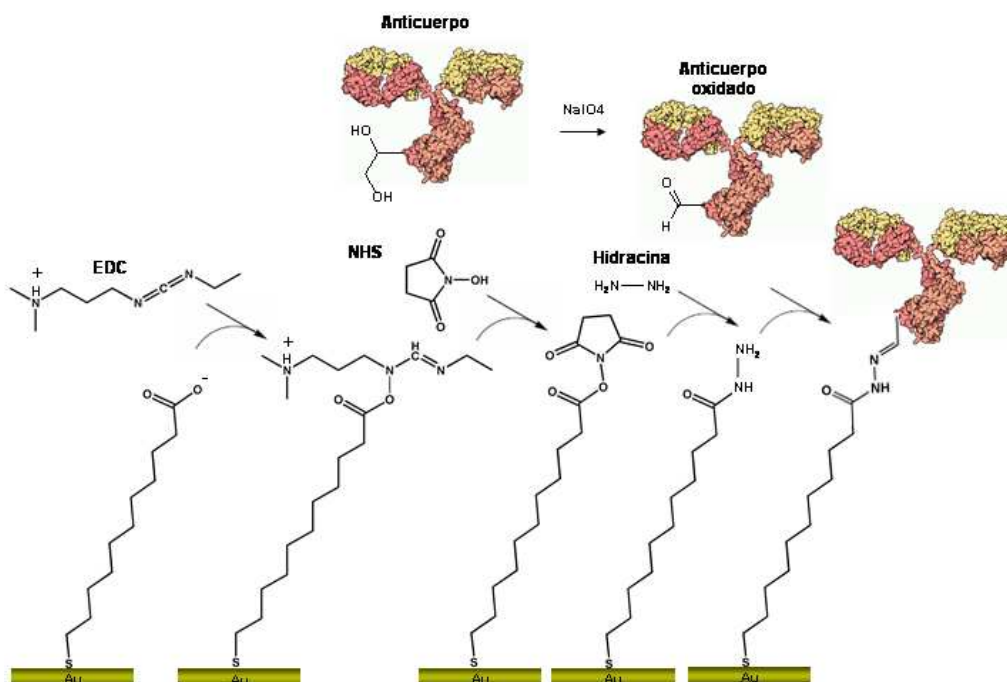


Figura 6.2. Esquema de la reacción de acoplamiento de los grupos carboxilo de la SAM con los grupos carbohidrato de un anticuerpo.

Como se muestra en la Figura 6.3, primero se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó la disolución de hidracina, que no produjo un incremento en la señal SPR debido a su reducido peso molecular, de tan sólo 32.05 g mol^{-1} . Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina. Una vez funcionalizada la superficie con hidracina, se estableció un flujo continuo de tampón PBST y se inyectó el anticuerpo oxidado, cuyo incremento de señal da una idea de la cantidad inmovilizada, aunque será la señal producida por la unión del antígeno la que proporcionará información de la funcionalidad de la capa formada. Una vez llevada a cabo la inmovilización se hizo ésta comprobación, sin que se produjera señal debida a la interacción con la hGH en ninguna de las superficies utilizadas. Aunque la señal SPR nos indica que se inmoviliza una elevada cantidad de masa sobre

la superficie, el anticuerpo no es funcional. Esto puede ser debido a que la inmovilización covalente pueda situar a la molécula en una orientación que no sea adecuada, o a que el proceso de inmovilización pueda haber afectado a la molécula.

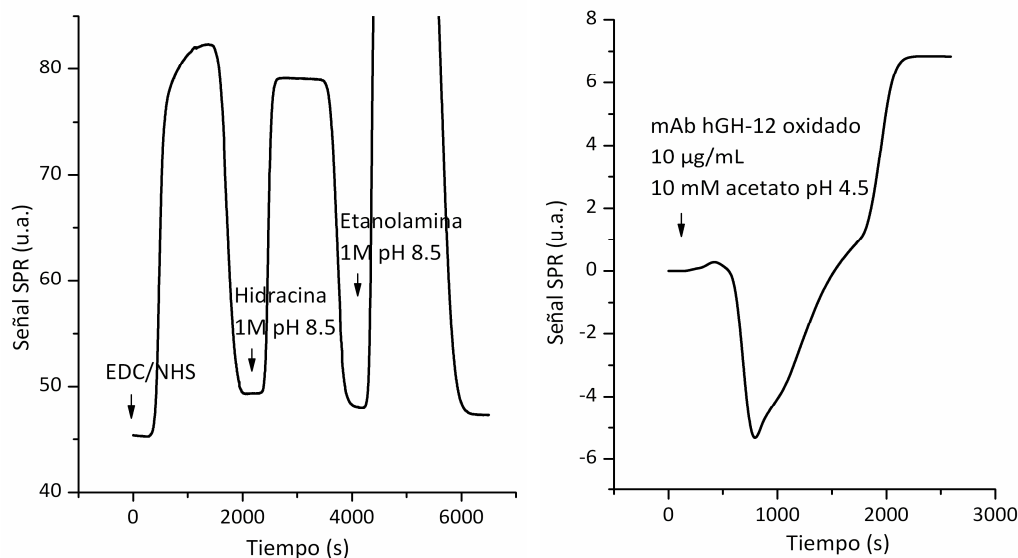


Figura 6.3. Sensogramas representativos del proceso de inmovilización covalente del anticuerpo hGH-12 oxidado en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 1$

6.2. Inmovilización por captura

La inmovilización por captura de los anticuerpos se ensayó haciendo uso del sistema estreptavidina-biotina, que se ha descrito en el punto 1.6.1. Para ello es necesario biotinilar el anticuerpo e inmovilizar la proteína estreptavidina en la superficie del sensor (Fig 6.4). En este trabajo se han probado diferentes estrategias para éstos dos propósitos.

La biotinilación del anticuerpo se llevó a cabo utilizando dos reactivos, la NHS-LC-Biotina y la Biotina-LC-Hidracida. La NHS-LC-Biotina (Fig 6.5) posee un grupo carboxilo activado como éster de NHS y se acopla a los grupos amino primario del anticuerpo, formando un enlace amida [4, 5]. En cuanto a la Biotina-LC-Hidracida (Fig 6.4), es un reactivo de gran utilidad para la biotinilación de macromoléculas a través de

sus grupos carbohidrato cuando éstos han sido oxidados para formar aldehídos [6]. El grupo hidracida reacciona con grupos carbonilos resultando en un enlace hidrazona.

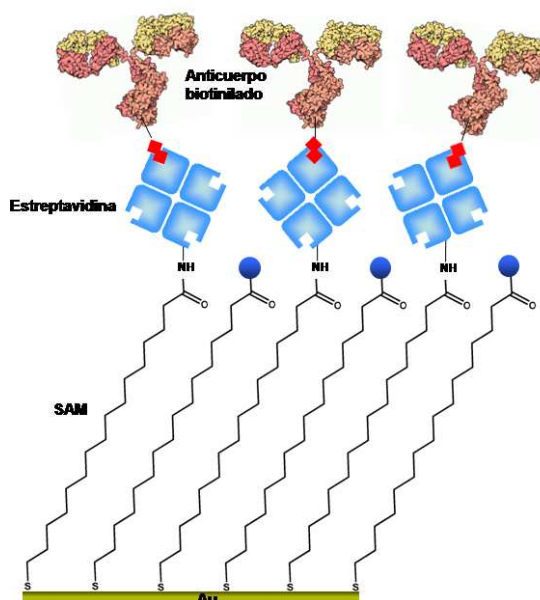


Figura 6.4. Representación esquemática del método de inmovilización de anticuerpos mediante SAM mixtas funcionalizadas con biotina.

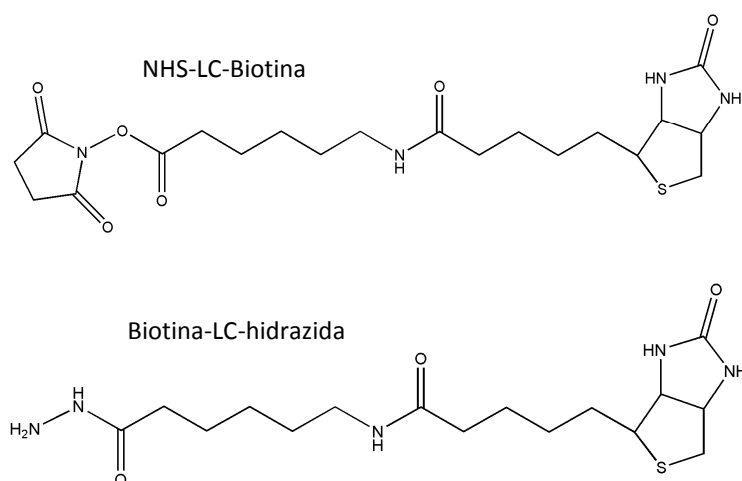


Figura 6.5. Estructuras de los reactivos de biotinilación

Se llevó a cabo la biotinilación del anticuerpo hGH-12 mediante la NHS-LC-Biotina. Este reactivo puede biotinilar varios grupos amino del anticuerpo simultáneamente, por lo que es necesario ajustar la cantidad utilizada en la reacción. Se utilizaron diferentes proporciones del reactivo, alcanzando excesos molares de 50, 25, 10 y 5 veces respecto al anticuerpo, para poder comprobar el efecto del grado de incorporación múltiple de biotina. Con el reactivo Biotina-LC-Hidracida se biotiniló solamente con la cantidad de reactivo recomendada por el fabricante, ya que en este caso no existe posibilidad de marcar múltiples zonas del anticuerpo simultáneamente.

La inmovilización de estreptavidina se probó por medio del acoplamiento amino. El primer paso a la hora de encontrar las mejores condiciones para la inmovilización es la elección del pH de inmovilización. Las señales obtenidas al inyectar diferentes disoluciones de estreptavidina en concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ para pH comprendidos entre 3.5 y 7.5 en el sensor modificado con la SAM de MUA sin activar se muestran en la Figura 6.6.

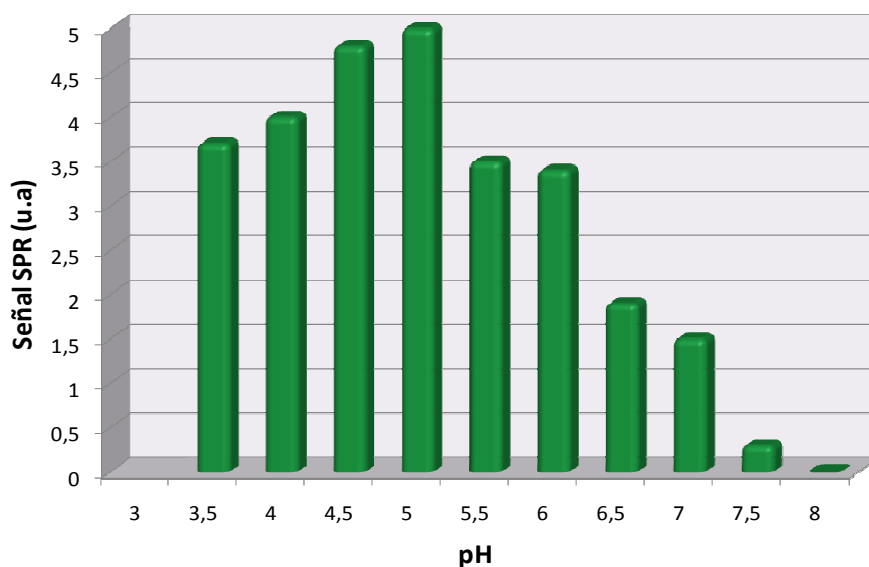


Figura 6.6. Representación de las señales SPR debidas a la adsorción de estreptavidina sobre la superficie sin activar utilizando disoluciones de diferentes pHs

De estos datos podemos concluir que la estreptavidina presenta un punto de máxima adsorción a pH 5, lo que es coherente con su punto isoelectrico de 5 [4] y con

el mecanismo explicado en el apartado 3.1. Al comparar los resultados con los obtenidos para las proteínas inmovilizadas anteriormente (hGH, hFSH, hLH y hTSH) podemos observar como las señales SPR de adsorción son mucho más pequeñas, lo que podría deberse a su bajo punto isoelectrico.

Se utilizaron diferentes superficies sensoras con SAMs mixtas de los alcanotioles MHDA y MUOH en fracciones molares (χ_{MHDA}) de 1, 0.2, 0.1, 0.05 y 0.02. En todas las superficies se siguió el mismo protocolo para la inmovilización de estreptavidina (Fig 6.7). Primero se llevó a cabo la activación de los grupos carboxilo de la superficie con EDC/NHS y seguidamente se inyectó una disolución de estreptavidina a 50 $\mu\text{g/mL}$ en 10 mM de acetato a pH 5. Finalmente, se bloquearon los grupos carboxilo que pudieran quedar activados mediante una disolución de etanolamina. Una vez funcionalizada la superficie con estreptavidina, se estableció un flujo continuo de tampón PBST y se inyectó el anticuerpo hGH-12, biotinilado con el reactivo NHS-LC-Biotina en una relación molar de 50 del reactivo respecto al anticuerpo, cuyo incremento de señal da una idea de la cantidad inmovilizada.

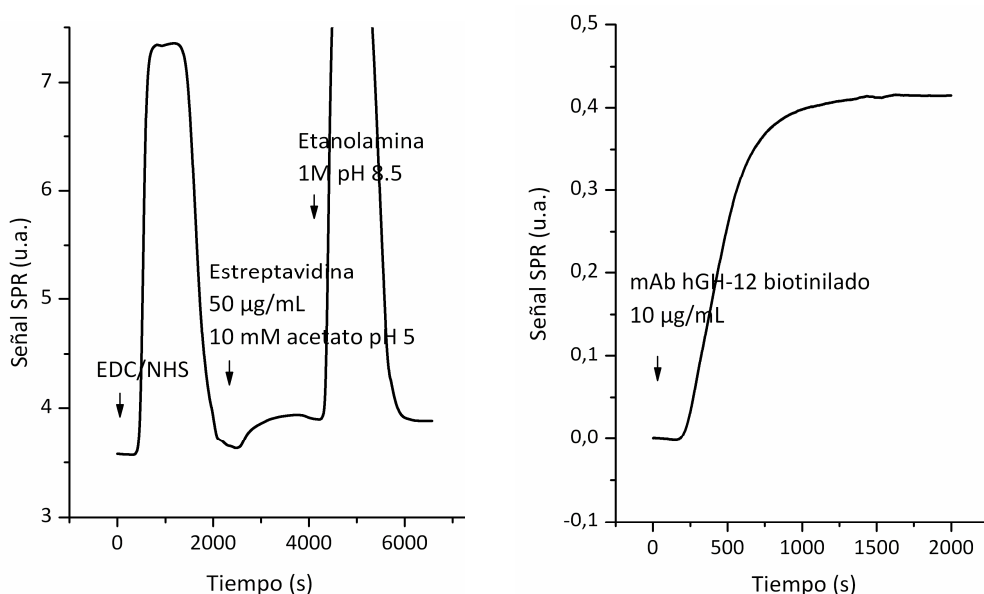


Figura 6.7. Sensogramas representativos del proceso de inmovilización de estreptavidina de forma covalente y la unión por afinidad del anticuerpo hGH-12 biotinilado en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0,1$.

En la figura 6.8. se representan las señales producidas por la inmovilización de estreptavidina y mAb-hGH-12 biotinilado en las superficies con SAMs mixtas de diferentes composición. La primera conclusión que se puede extraer es que la señal debida a la inmovilización de estreptavidina es muy baja, entre 2.5 y 3.5 unidades, en contraste con los niveles de inmovilización obtenidos para otras proteínas, de entre 7 y 12 unidades, lo que puede explicarse por la reducida atracción con la superficie del sensor que se ha observado en experimentos previos. Aunque la cantidad de estreptavidina inmovilizada no muestra una relación directa con la proporción de la SAM mixta, la posterior unión del anticuerpo biotinilado se ve favorecida en la SAM con una $\chi_{\text{MHDA}} = 0.1$.

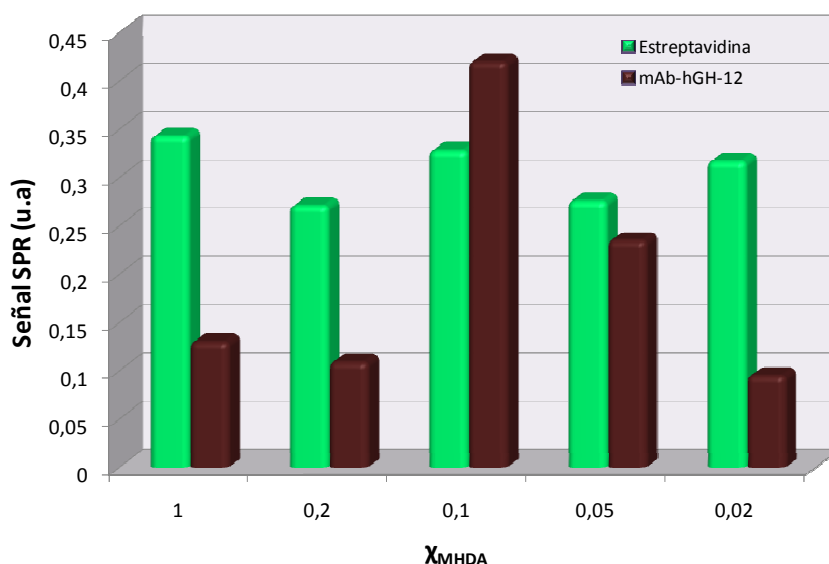


Figura 6.8. Representación de las señales producidas por la inmovilización de estreptavidina y la posterior unión del anticuerpo biotinilado

Una vez llevada a cabo la inmovilización del anticuerpo biotinilado se realizó la comprobación de su funcionalidad mediante la inyección de su antígeno, la hGH a 1 $\mu\text{g/mL}$, produciéndose solamente interacción en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.1$ (Fig 6.9). Sin embargo, la señal es muy reducida y no permitiría la detección de hGH en los niveles de concentraciones deseados, del orden de los ng/mL . La explicación de este resultado puede deberse a que el anticuerpo biotinilado necesite una

distribución adecuada de estreptavidina sobre la superficie para inmovilizarse correctamente. Debido a que la estreptavidina presenta cuatro sitios de unión para la biotina en su estructura no es necesario controlar la orientación de la molécula en su inmovilización.

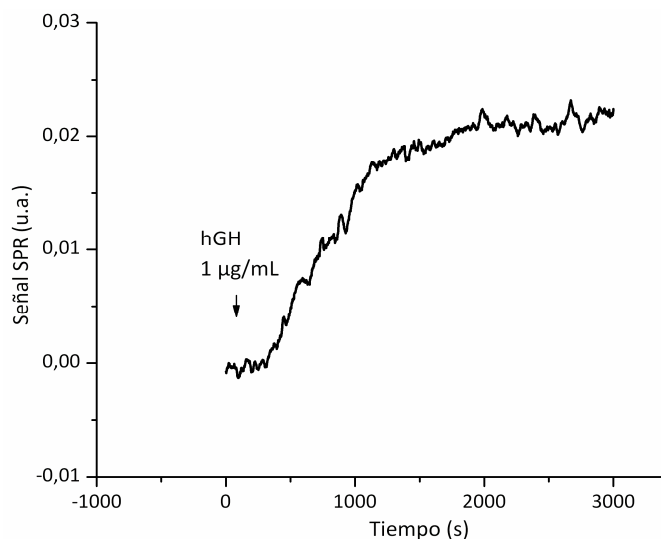


Figura 6.9. Señal SPR correspondiente a la detección de hGH en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0,1$.

De cara a mejorar los resultados obtenidos sería necesario alcanzar una distribución adecuada de la SAM mixta de tal forma que proporcione una mejor inmovilización de estreptavidina y una mayor unión de anticuerpo biotinilado, permitiendo que el anticuerpo mantenga su funcionalidad para la detección del antígeno. Se realizó un estudio más amplio de la distribución de las SAMs haciendo uso de superficies con SAMs mixtas de $\chi_{\text{MHDA}} = 1, 0,2, 0,1, 0,05, 0,033, 0,02, 0,013$ y $0,01$.

Debido al mal rendimiento de la inmovilización covalente de estreptavidina se cambió a otra estrategia de inmovilización mediante afinidad. En este caso, se llevó a cabo la inmovilización de biotina sobre la superficie de los sensores con las SAMs mixtas mediante el reactivo Biotina-LC-Hidracida. Una vez biotinilada la superficie, se formó una capa de estreptavidina mediante su interacción de extrema afinidad con la biotina, que permite sortear los problemas surgidos en la estrategia de inmovilización covalente. Considerando que la molécula de estreptavidina presenta en su estructura

cuatro sitios de unión para la biotina, es posible unir los anticuerpos biotinilados a la superficie mediante la capa de estreptavidina formada previamente (Fig 6.10).

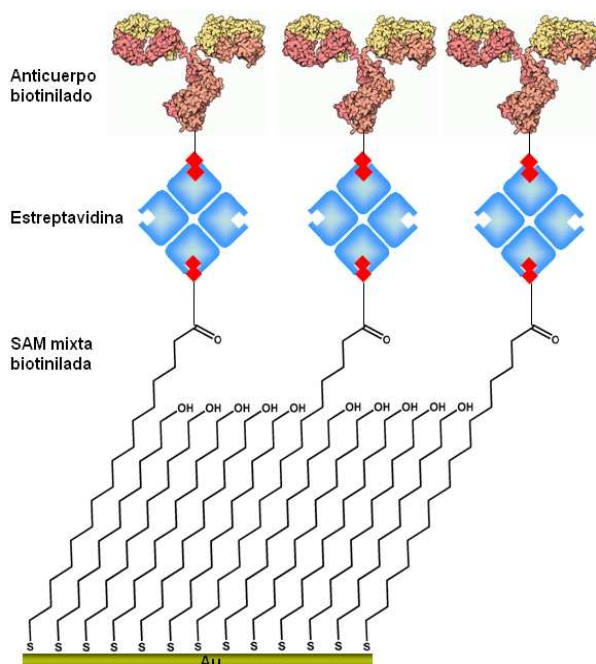


Figura 6.10. Representación esquemática del método de inmovilización de anticuerpos mediante SAM mixtas funcionalizadas con biotina.

Las superficies con diferentes SAMs mixtas fueron activadas con EDC y NHS, para ser posteriormente funcionalizadas mediante una disolución de Biotina-LC-Hidrazida 5 mM en tampón 10 mM de acetato a pH 4.5 y posteriormente bloqueadas con etanolamina (Fig 6.11). Posteriormente, se estableció un flujo continuo de tampón PBST y se inyectó estreptavidina (Fig 6.11). Finalmente, se unió por afinidad el anticuerpo hGH-12, biotinilado con el reactivo NHS-LC-Biotina en una relación molar de 50 del reactivo respecto al anticuerpo (Fig 6.12). En la Figura 6.13 se comparan las señales producidas por la inmovilización de estreptavidina y por la unión del anticuerpo en las diferentes superficies. En primer lugar, se observa como con ésta nueva estrategia se consigue una mejor inmovilización de estreptavidina que en el caso de la inmovilización covalente. Los mayores niveles de inmovilización se alcanzan en las SAMs de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.1, 0.05, 0.033$ y 0.02 , siendo la mejor distribución para la de $\chi_{\text{MHDA}} =$

0.02. En cuanto a la posterior inmovilización del anticuerpo biotinilado, es también esta distribución de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ la que produce un mejor resultado.

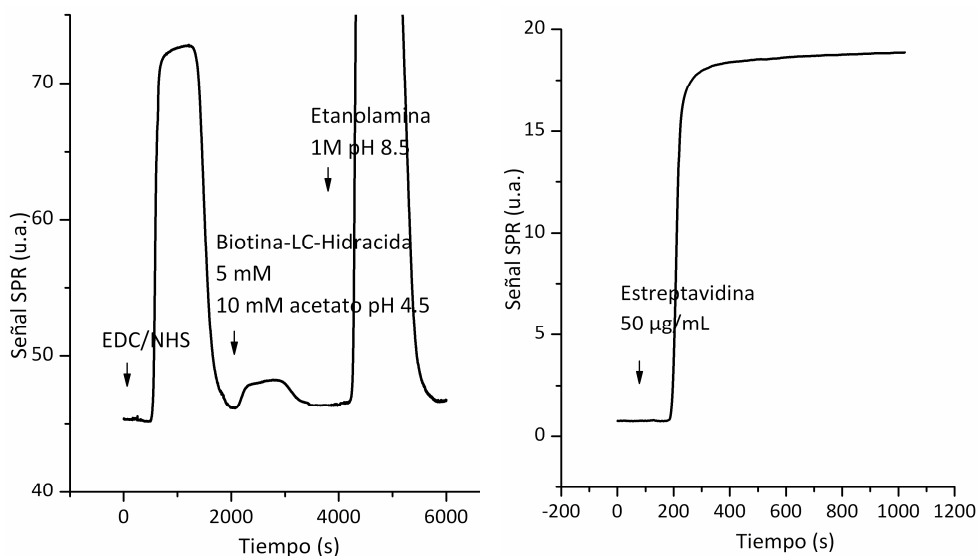


Figura 6.11. Sensogramas representativos del proceso de inmovilización de biotina y la unión por afinidad estreptavidina en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0,02$.

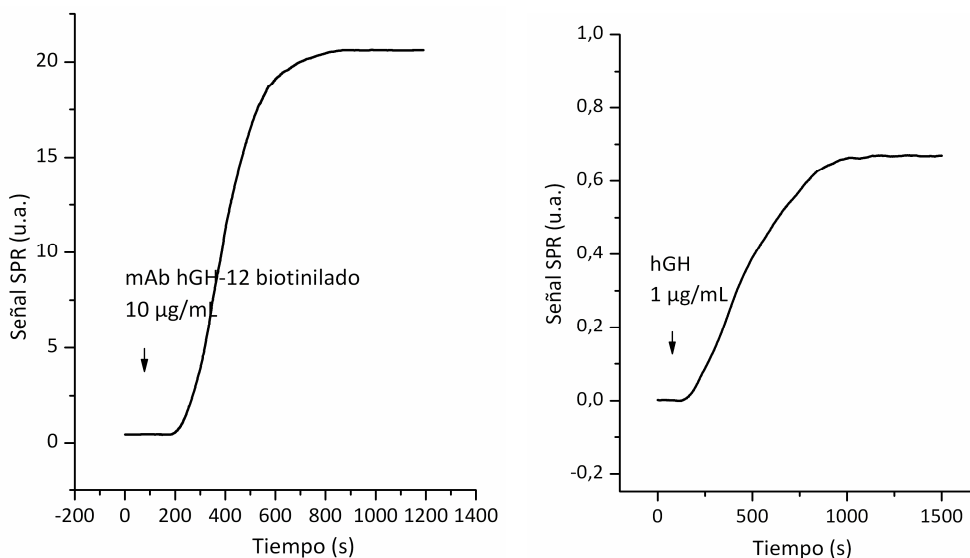


Figura 6.12. Sensogramas representativos del proceso de la unión por afinidad del anticuerpo y la posterior detección de la hGH en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0,02$.

Una vez llevada a cabo la inmovilización del anticuerpo biotinilado se comprobó su funcionalidad mediante la inyección de su antígeno, la hGH a 1 $\mu\text{g/mL}$, produciéndose una señal apreciable únicamente en la superficie con una SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ (Fig 6.12). La señal obtenida, aunque todavía insuficiente para llevar a cabo la detección de concentraciones reducidas de hGH, mejora en un factor de más de 3 la señal obtenida mediante la estrategia de inmovilización directa de estreptavidina. Por ello se eligió esta SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ como la superficie óptima para la inmovilización de anticuerpos a través de la estreptavidina.

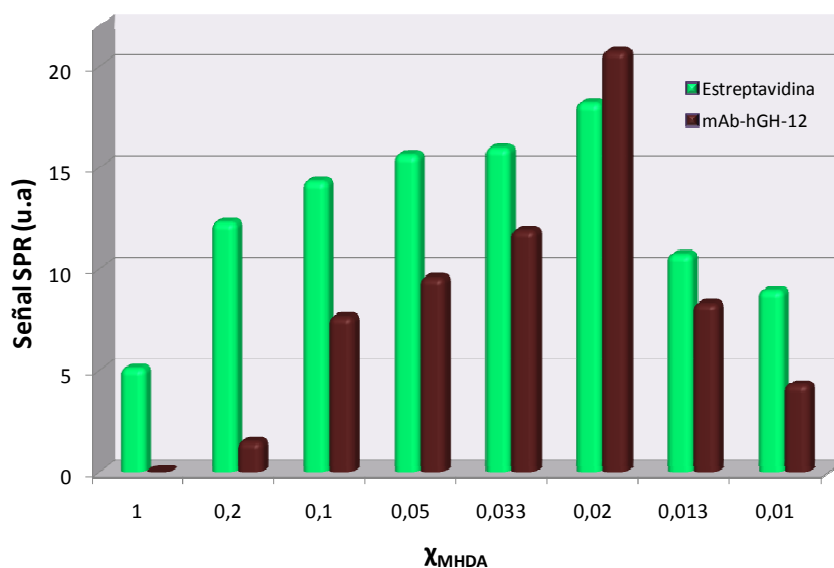


Figura 6.13. Representación de las señales obtenidas en la inmovilización de estreptavidina y anticuerpo hGH-12 biotinilado en las diferentes SAMs mixtas

La distribución de la superficie de estreptavidina se muestra como un parámetro crítico a la hora de llevar a cabo la estrategia de inmovilización por captura. Estos resultados están en consonancia con algunos estudios previos [7-9] que demuestran que un empaquetamiento demasiado alto de las moléculas de biotina es menos efectivo para el acoplamiento de la estreptavidina. Debido a la naturaleza de la interacción entre estas dos moléculas, la biotina ha de insertarse completamente dentro de la estructura de la estreptavidina. Es necesario por ello alcanzar una proporción adecuada del alcanotiol espaciador junto con una apropiada longitud de la cadena del alcanotiol funcionalizado, que evite que se produzca un impedimento estérico y permita mantener la biotina

separada del resto de la capa, proporcionándole un entorno adecuado para la interacción con la estreptavidina (Fig 6.10). Gracias al alto nivel de control sobre las propiedades de la superficie que proporciona la química de las SAM, sería posible alcanzar la distribución superficial más adecuada.

Por otro lado, también se comprobó el efecto del proceso de biotinilación sobre la inmovilización del anticuerpo en la superficie funcionalizada con estreptavidina. El grado de biotinilación del anticuerpo puede afectar tanto a la inmovilización del anticuerpo sobre la superficie como a la posterior interacción con su antígeno. El tipo de acoplamiento de la biotina puede también tener influencia, ya que en el caso de utilizar el reactivo NHS-LC-Biotina, la presencia de grupos amino reactivos en toda la estructura del anticuerpo puede resultar en la biotinilación del anticuerpo en zonas que produzcan una pérdida de afinidad o una orientación inadecuada de la molécula. El uso del reactivo Biotina-LC-Hidrazida podría resolver éste problema, debido a su mayor especificidad, ya que reacciona con los grupos carbohidrato, previamente oxidados, presentes en el fragmento Fc del anticuerpo (ver Fig 1.2), lo que produciría una inmovilización orientada de la molécula.

Se utilizaron diferentes superficies sobre las que se formó la SAM de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$, que se funcionalizaron con biotina y estreptavidina siguiendo el protocolo utilizado anteriormente. En cada una de estas superficies se comprobó el funcionamiento del anticuerpo hGH-12 biotinilado con el reactivo NHS-LC-Biotina en diferentes relaciones molares de 50, 25, 10 y 5 del reactivo respecto al anticuerpo. También se comprobó el funcionamiento del anticuerpo biotinilado con Biotina-LC-Hidrazida. En todas éstas superficies, una vez llevada a cabo la inmovilización del anticuerpo biotinilado, se comprobó su funcionalidad mediante la inyección del antígeno correspondiente, la hGH a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$.

La Figura 6.14 muestra las señales SPR producidas por la inmovilización del anticuerpo hGH-12 biotinilado con NHS-LC-Biotina en los diferentes ratios molares de reactivo así como las señales de reconocimiento de la hGH producidas en cada caso. El exceso molar de 50 es el que produce una inmovilización más elevada del anticuerpo y una mejor señal de reconocimiento. Aunque se ha realizado un gran avance en las condiciones de inmovilización del anticuerpo, logrando detectar la señal de interacción

con el antígeno, es necesario todavía mejorar ligeramente el proceso para poder detectar cantidades de hGH en el orden de los ng/mL de forma directa.

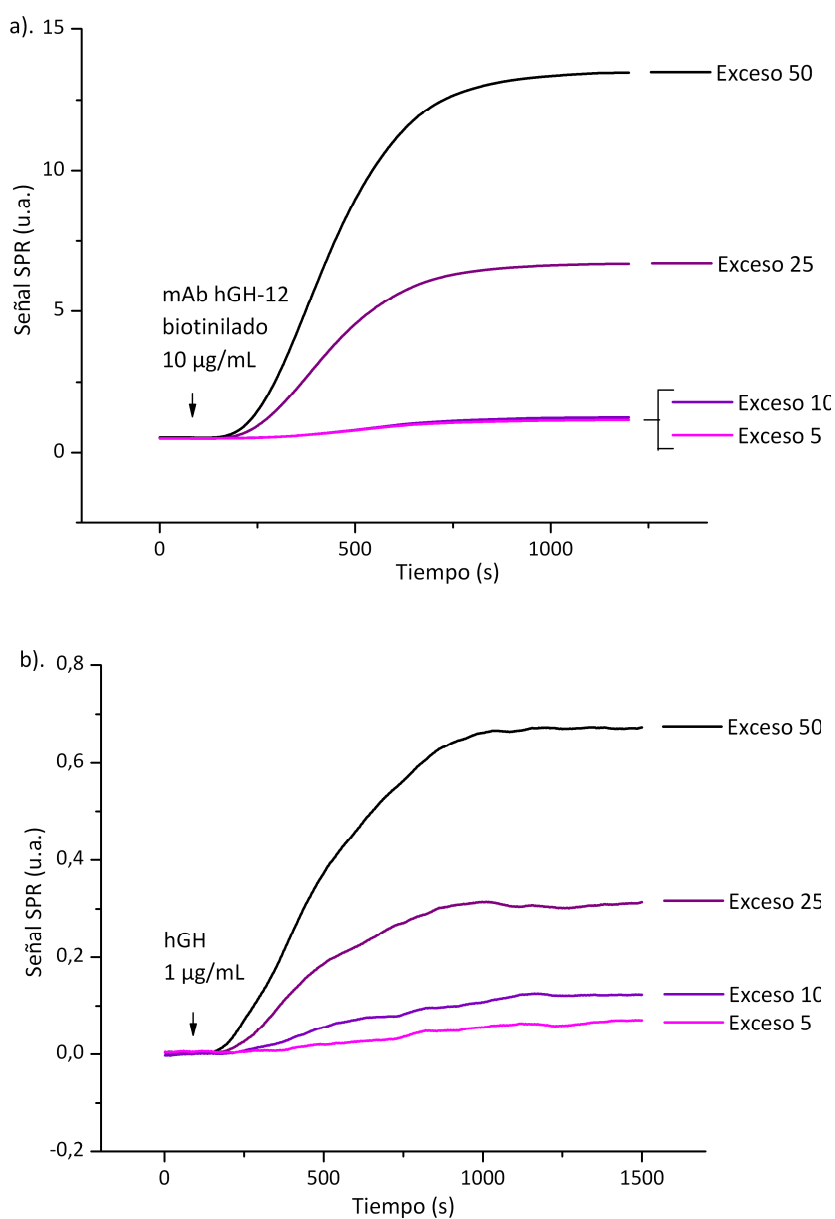


Figura 6.14. Señales SPR de (a) la inmovilización del anticuerpo hGH-12 biotinilado y (b) del reconocimiento de la hGH

En el caso del anticuerpo biotinilado con Biotina-LC-Hidrazida, aunque se observó una señal de inmovilización adecuada, no se observó ninguna señal debida a la

interacción con la hGH, por lo que por el momento se descartó éste método de inmovilización. Es posible que las condiciones utilizadas en la oxidación y biotinilación del anticuerpo pudieran afectar a la afinidad del anticuerpo, por lo que sería conveniente profundizar en esta línea en un futuro para encontrar las condiciones adecuadas para la biotinilación del anticuerpo en la cadena de carbohidrato.

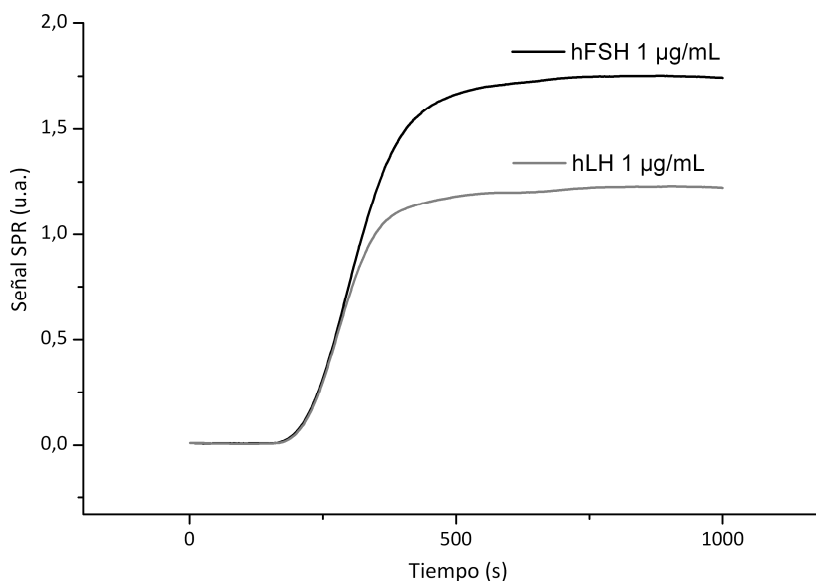


Figura 6.15. Señales correspondientes a la detección de de hFSH y hLH

Una vez establecidas las mejores condiciones de inmovilización, se comprobó el funcionamiento de este protocolo con el anticuerpo hCG-21, que reconoce la subunidad α común presente en las estructuras de las hormonas hFSH, hLH, hTSH y hCG. Se utilizó una superficie sobre la que se formó una SAM mixta de $\chi_{\text{MHDA}} = 0.02$ y se funcionalizó con biotina y estreptavidina siguiendo el protocolo utilizado anteriormente. En esta superficie se inmovilizó el anticuerpo hCG-21, biotilado con el reactivo NHS-LC-Biotina en una relación molar de 50 del reactivo respecto al anticuerpo. A continuación, se comprobó su funcionalidad mediante la inyección de hFSH y hLH a 1 µg/mL. La señal de reconocimiento en este caso (Fig 6.15) constituye más del doble de la obtenida en las mismas condiciones para la hGH, lo que puede deberse a la mayor afinidad del anticuerpo hCG-21 (Ver Tabla 2.1) y al mayor peso molecular de éstas hormonas.

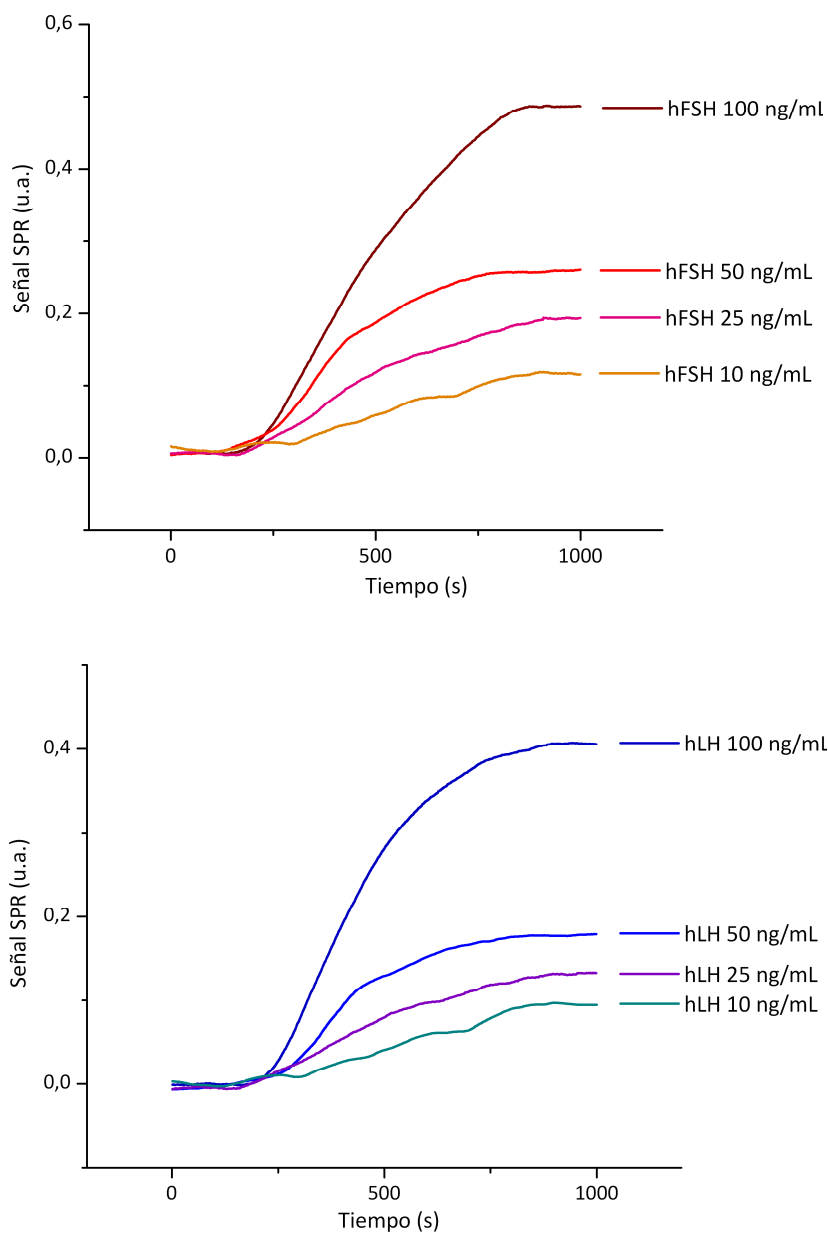


Figura 6.16. Señales correspondientes a la detección de diferentes concentraciones de hFSH y hLH

Una vez comprobada la funcionalidad del anticuerpo inmovilizado, se verificó el funcionamiento del inmunoensayo en formato directo para la detección de cantidades más bajas de éstas hormonas. Para ello se inyectaron concentraciones de hFHS y hLH

de 100, 50, 25 y 10 ng/mL. La ruptura de la interacción tras cada ciclo de medida para la completa regeneración de la superficie se consiguió mediante una disolución de HCl 5 mM, aunque la reutilización de la superficie no es satisfactoria, ya que su funcionamiento se ve drásticamente reducido tras alrededor de 10 ciclos de medida y regeneración. La Figura 6.16 muestra las señales producidas por estas disoluciones. De los valores obtenidos se puede estimar un límite de detección de alrededor de 1 ng /mL aproximadamente, calculado como la concentración que proporciona una señal de tres veces la desviación estándar de las muestras blanco. Aunque la sensibilidad del dispositivo es satisfactoria, la reutilización no es adecuada, por lo que en el futuro será necesario realizar un estudio más exhaustivo de las condiciones de regeneración que permitan llevar a cabo un estudio más amplio de las características del inmunoensayo directo.

6.3. Conclusiones

En este estudio se ha logrado el control de la densidad superficial de moléculas de biotina que permiten una inmovilización óptima de la estreptavidina para la posterior incorporación de anticuerpos funcionalizados con biotina. Utilizando ésta estrategia se ha logrado inmovilizar los anticuerpos de forma funcional y detectar la interacción con su antígeno en niveles de concentración del orden de ng/mL, lo que es equivalente a un intervalo de 100 – 200 pM.

Hay que tener en cuenta que los anticuerpos utilizados han sido seleccionados para aplicaciones de EIA y RIA y no específicamente para su utilización en el biosensor de SPR, por lo que el funcionamiento del ensayo podría mejorar en parte llevando a cabo una producción de anticuerpos especialmente diseñada para esta aplicación. Todavía se pueden realizar algunas mejoras en cuanto a la orientación del anticuerpo en la superficie. En este sentido podría ser interesante trabajar en mejorar la biotilación específica en las funciones carbohidrato de los anticuerpos o aplicar algunas alternativas como la utilización de fragmentos de anticuerpos o anticuerpos modificados genéticamente con grupos funcionales o marcadores adecuados para facilitar su inmovilización orientada.

La utilización de ensayos de tipo sándwich, podría abrir la posibilidad de construir inmunosensores capaces de detectar varios analitos relacionados, además de proporcionar una amplificación de la señal, que permitiese detectar concentraciones del analito aún más reducidas,. Un ejemplo de este tipo de aplicación sería un inmunosensor funcionalizado con el anticuerpo hGH-12, capaz de detectar todas las isoformas de la hGH, y que mediante un formato de ensayo de tipo sándwich, utilizando anticuerpos específicos de cada isoforma de la hormona, permitiera determinar la proporción entre sus concentraciones. Esta aplicación podría ser de gran utilidad para la detección del dopaje con hGH, ya que esta aplicación se basa en la determinación de la relación de las concentraciones de las isoformas de 20 kDa y 22 kDa de ésta hormona en la circulación. Un ensayo similar utilizando un inmunosensor funcionalizado con el anticuerpo hCG-21, capaz de unirse a la hCG, hFSH, hLH y hTSH, permitiría llevar a cabo la detección de cualquiera de estas hormonas utilizando un anticuerpo secundario específico de cada una de ellas.

La utilización de otro tipo de transductores con una mayor sensibilidad podría permitir alcanzar niveles de detección algo más bajos, en un intervalo de 10 – 100 pM, adecuados para algunas de las aplicaciones diagnósticas propuestas. Entre los dispositivos desarrollados en nuestro grupo destaca un novedoso biosensor de resonancia de plasmón superficial magneto-óptica (MOSPR) [10] que combina la actividad magneto-óptica de materiales ferromagnéticos y la resonancia de plasmón superficial de capas metálicas. Esta combinación produce un marcado incremento de los efectos magneto-ópticos, que dependen de las propiedades ópticas del medio adyacente, lo que permite su uso para aplicaciones biosensoras. La optimización de las capas metálicas y del dispositivo experimental, en los que se trabaja actualmente, podría producir una mejora de hasta un orden de magnitud en el límite de detección. Los experimentos preliminares muestran que es posible trasladar a este dispositivo los métodos de inmovilización y ensayos desarrollados en el sensor SPR.

6.4. Referencias

1. Lu, B., M.R. Smyth, and R. O'Kennedy, *Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors*. Analyst, 1996. **121**(3): p. 29-32.
2. Peluso, P., et al., *Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays*. Analytical Biochemistry, 2003. **312**(2): p. 113-124.
3. O'Shannessy, D.J. and M. Wilchek, *Immobilization of glycoconjugates by their oligosaccharides: Use of hydrazido-derivatized matrices*. Analytical Biochemistry, 1990. **191**(1): p. 1-8.
4. Green, N.M., *Avidin and streptavidin*, in *Methods in Enzymology*. 1990, Academic Press. p. 51-67.
5. Wilchek, M. and E.A. Bayer, *The avidin-biotin complex in bioanalytical applications*. Analytical Biochemistry, 1988. **171**(1): p. 1-32.
6. O'Shannessy, D.J. and R.H. Quarles, *Labeling of the oligosaccharide moieties of immunoglobulins*. Journal of Immunological Methods, 1987. **99**(2): p. 153-161.
7. Haussling, L., et al., *Biotin-Functionalized Self-Assembled Monolayers on Gold - Surface-Plasmon Optical Studies of Specific Recognition Reactions*. Langmuir, 1991. **7**(9): p. 1837-1840.
8. Spinke, J., et al., *Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers*. Langmuir, 1993. **9**(7): p. 1821-1825.
9. Spinke, J., et al., *Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization*. Journal of Chemical Physics, 1993. **99**: p. 7012.
10. Sepulveda, B., et al., *Highly sensitive detection of biomolecules with the magneto-optic surface-plasmon-resonance sensor*. Optics letters, 2006. **31**(8): p. 1085-7.

Conclusiones generales

La mayor parte de los objetivos planteados al comienzo de este estudio han sido satisfactoriamente alcanzados. Se ha demostrado que el dispositivo SPR representa un instrumento valioso e innovador para la determinación de biomarcadores en fluidos biológicos y, por tanto, puede constituir una valiosa herramienta para el diagnóstico rápido en laboratorios clínicos y en puntos de atención médica (POC). La metodología que se ha desarrollado permite llevar a cabo la determinación de las hormonas pituitarias de una forma rápida, sencilla y en tiempo real, sin necesidad de utilizar marcadores, usando un volumen reducido de suero o de orina de tan sólo 110 μL y sin llevar a cabo ningún tipo de pretratamiento.

Los inmunoensayos SPR de inhibición desarrollados presentan niveles de sensibilidad que permiten la determinación de las hormonas pituitarias hTSH, hFSH, hLH y hGH, en concentraciones de hasta 1 ng/mL, lo que es equivalente a un intervalo de 25 – 50 pM. Aunque este nivel de sensibilidad es más bajo que el obtenido con algunas de las técnicas inmunométricas convencionales, los valores son adecuados para diversas aplicaciones diagnósticas. Al mismo tiempo, el inmunoensayo SPR proporciona ciertas ventajas adicionales sobre éstas técnicas, ya que la simplicidad del equipo permite llevar a cabo una determinación rápida y sencilla que puede llevarse a cabo cerca del paciente, consiguiendo un mejor tratamiento de la enfermedad, al verse reducidos los tiempos de logística y transporte de las muestras y gestión de los resultados. Este tipo de métodos de diagnóstico puede ser muy beneficioso para el tratamiento de algunas enfermedades, al poder obtener resultados inmediatos directamente en los puntos de atención médica (POC).

En todos los casos se ha llevado a cabo el estudio de las condiciones de inmovilización del elemento de reconocimiento biológico más adecuadas para conseguir la formación de una capa estable y controlada en la superficie del sensor. El uso de SAMs proporciona un excelente método de inmovilización, debido a la simplicidad, reproducibilidad y fiabilidad del proceso. Se han optimizado las condiciones de inmovilización individualmente para cada una de las hormonas,

incluyendo el pH del tampón de inmovilización más adecuado para el pI de cada una y la concentración de la molécula inmovilizada, para obtener un funcionamiento del ensayo apropiado. De esta manera, se ha conseguido alcanzar una sensibilidad adecuada, asegurando la reutilización y la estabilidad del dispositivo, manteniendo su actividad intacta a lo largo de un elevado número de ciclos de medida y regeneración.

Posteriormente se han seleccionado los anticuerpos que mejor funcionamiento han mostrado, entre los disponibles para cada uno de los analitos, en función de su grado de unión al antígeno inmovilizado en la superficie del dispositivo y de la sensibilidad obtenida en el formato de inmunoensayo de inhibición. Además, se ha ajustado la cantidad de anticuerpo utilizada en el inmunoensayo, ya que constituye uno de los factores primordiales que influyen en su sensibilidad. La comprobación de la especificidad de los anticuerpos en este formato de inmunoensayo SPR ha resultado satisfactoria y permite la determinación independiente de éstas hormonas en muestras complejas que contengan varios de éstos analitos estructuralmente relacionados.

Para poder llevar a cabo la determinación de los analitos en fluidos biológicos ha sido necesario buscar las condiciones experimentales apropiadas, como la concentración de anticuerpo, la composición del tampón del ensayo y la disolución de regeneración, que permitan alcanzar el mejor funcionamiento y a la vez reduzcan la unión inespecífica de los componentes de la matriz sobre la superficie del sensor. Mediante el uso de SAMs como matriz de inmovilización y de unas condiciones experimentales adecuadas se ha conseguido una reducción drástica de la unión inespecífica, lo que unido a la elevada afinidad y especificidad de los anticuerpos empleados hace posible la detección de las interacciones específicas sobre la señal de fondo inespecífica, sin necesidad de llevar a cabo ningún proceso de tratamiento o dilución de la muestra.

La robustez de estos métodos ha quedado verificada por la excelente reproducibilidad y la estabilidad de la señal a lo largo de los numerosos ciclos de medida y regeneración efectuados. La reproducibilidad de los ensayos se ha demostrado mediante el estudio de la variabilidad intra- en inter-ensayo y entre diferentes lotes de superficies sensoras, que en todos los casos presentan valores muy por debajo del 10%. La reutilización adecuada de los dispositivos, que permite que el dispositivo tenga un

tiempo de vida adecuado, ha sido lograda buscando las condiciones de regeneración apropiadas que han permitido disociar cada interacción con las condiciones más suaves posibles en cada caso. De esta manera se han llevado a cabo series de hasta 100 ciclos de medida y regeneración a lo largo de hasta 10 días consecutivos de trabajo continuo.

En resumen, la optimización del proceso de inmovilización de las hormonas y de los parámetros de los inmunoensayos, junto con la selección de los mejores anticuerpos disponibles en cada caso, determinan el excelente funcionamiento de los ensayos desarrollados. El uso de SAMs proporciona un excelente método de inmovilización y una adecuada reducción de la unión inespecífica en la superficie que unida a la gran afinidad y especificidad de los anticuerpos utilizados y a la optimización de las condiciones del ensayo en muestras de suero y orina, hace posible la detección de las interacciones bioespecíficas directamente en muestras tan complejas.

Específicamente, en lo que se refiere al inmunoensayo SPR para la determinación de hGH en suero, se ha logrado el objetivo de determinar un analito de relevancia clínica en muestras de suero. Se ha logrado una reducción de la unión inespecífica de los componentes del suero en un 88% mediante la modificación de la composición del tampón del ensayo, demostrando que este factor puede tener un efecto drástico en la reducción de la unión inespecífica, la cual constituye uno de los problemas centrales en el desarrollo de biosensores SPR. Según nuestro conocimiento este es el primer biosensor para la determinación de hGH y la primera aplicación de un biosensor de SPR que permite llevar a cabo la determinación directa de un analito en muestras de suero en niveles de concentración de relevancia clínica sin necesidad de dilución o pretratamiento de la muestra. La sensibilidad del método, con un LOD en suero de 6 ng/mL, que equivale a 300 pM, es adecuada para el diagnóstico de la deficiencia en la secreción de hGH, para el que se acepta un nivel de corte de 10 ng/mL de hGH en pruebas de estimulación.

La robustez del método ha sido verificada por una excelente reproducibilidad y por la estabilidad de la señal. La reproducibilidad del método quedó probada por los bajos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo y entre diferentes superficies sensoras, todos por debajo del 5%. La señal se mantuvo estable a lo largo de 50 ciclos de medida y regeneración en suero, durante 5 días de funcionamiento continuo. La

validación de la determinación de hGH mediante este método se llevó a cabo mediante la medida de muestras de suero de pacientes procedentes de pruebas de estimulación para el diagnóstico de deficiencia de hGH usando el método de inmunoensayo de SPR y comparándolo con el método ELISA. La buena correlación de los datos demuestra que la aplicación de ésta técnica puede ser de gran utilidad como herramienta de diagnóstico rápido tanto en laboratorios clínicos como en puntos de atención primaria (POC).

En cuanto al inmunoensayo SPR para las hormonas gonadotrópicas hFSH y hLH, se ha logrado la determinación multianalito de ambas hormonas en orina mediante los procedimientos de inmovilización individual o simultánea. Por medio de una inmovilización simultánea, las determinaciones se llevaron a cabo mediante los procedimientos secuencial y aditivo, mostrando ambos formatos sensibilidades muy similares. La utilización de este formato de ensayo permite expandir la capacidad de medida del dispositivo para varios analitos, reducir el tiempo de análisis y exponer menos el receptor a los posibles daños causados por las condiciones de regeneración.

Para obtener un funcionamiento similar al formato de inmovilización individual, es necesario encontrar la combinación adecuada de las concentraciones de ambas hormonas en la mezcla de inmovilización simultánea. Mediante una adecuada concentración de cada hormona y una apropiada relación entre sus concentraciones se ha logrado alcanzar una distribución superficial que proporciona una sensibilidad similar a la obtenida en el formato de inmovilización individual. Este inmunoensayo SPR permite la determinación simultánea de hFSH y hLH en cada una de las celdas del dispositivo o, de forma simultánea, en la misma celda, de forma sencilla y rápida.

Una vez establecidos los parámetros del proceso de inmovilización y del inmunoensayo, se pasó a investigar las condiciones necesarias para poder llevar a cabo la determinación de los analitos en muestras de orina. Se caracterizaron las condiciones de medida y regeneración utilizando muestras de orina, que resultó ser una matriz de análisis menos problemática que el suero, lo que permite llevar a cabo una detección adecuada. La sensibilidad del inmunoensayo SPR permite la determinación multianalito de estas hormonas en orina a niveles de concentración de hasta 1 ng/mL, que equivalen

a 28 pM de hFSH y 35 pM de hLH, 8 mIU/mL de hLH y 14 mIU/mL de hFSH en unidades internacionales.

La detección de incrementos en las concentraciones de estas hormonas mediante este método puede ser de gran utilidad para el seguimiento endocrinológico y reproductivo de los pacientes. El inmunoensayo SPR proporciona un método rápido, en tiempo real y sin necesidad de marcadores, para la determinación de estas hormonas de forma directa y sin ningún tipo de pretratamiento en un reducido volumen de muestra de 110 μ L. La fiabilidad del ensayo quedó demostrada por su excelente reproducibilidad y estabilidad. Tanto la variabilidad intra- e inter- ensayo como entre diferentes superficies sensoras fueron menores del 10%. La estabilidad de la señal se mantuvo a lo largo de 100 ciclos de medida durante 6 días de funcionamiento continuo.

El inmunoensayo para la determinación de hTSH, por su parte, se ha optimizado y caracterizado, alcanzando un límite de detección de 2 ng/mL, lo que es equivalente a 80 pM. Este valor, que en unidades internacionales equivale a 15 μ IU/mL, constituye una sensibilidad adecuada para el diagnóstico de hipotiroidismo congénito. Se han investigado las condiciones necesarias para poder llevar a cabo la determinación de la hTSH en las muestras utilizadas en el cribado neonatal de hipotiroidismo congénito. De esta forma, se ha logrado, utilizando un tapón de ensayo adecuado, una reducción del 95% en la unión inespecífica de los componentes de la matriz. El reducido nivel de unión inespecífica permite detectar correctamente la interacción específica con el anticuerpo sobre la atenuada señal de fondo, por lo que se podría llevar a cabo el inmunoensayo de inhibición, pero la sensibilidad, en la práctica, no es adecuada.

El formato actual de las muestras que se utilizan para el cribado neonatal presenta algunos inconvenientes para nuestras medidas que podrían superarse mediante la obtención de las muestras de los pacientes por otro método más adecuado a nuestros requerimientos. De esta forma sería posible obtener resultados inmediatos más cerca del paciente, lo que podría tener un gran impacto en el tratamiento de esta enfermedad, especialmente en el caso de regiones desfavorecidas donde es complicado acceder al análisis actual.

Paralelamente al desarrollo de los inmunoensayos SPR de inhibición, se ha llevado a cabo el estudio del proceso de biofuncionalización de la superficie del sensor SPR con anticuerpos. El objetivo consistía en encontrar las condiciones apropiadas de inmovilización funcional de los anticuerpos, con una densidad superficial y una orientación adecuadas, que pueda hacer posible la realización de inmunoensayos directos o de tipo sándwich.

En este trabajo, se ha logrado la inmovilización de los anticuerpos de forma funcional mediante la utilización de un método de captura por afinidad a través del sistema estreptavidina-biotina. Se ha demostrado que el método de inmovilización que produce unos mejores resultados consiste en la funcionalización con biotina de la SAM para posteriormente formar una capa intermedia de estreptavidina que permita inmovilizar los anticuerpos biotinilados. La distribución de la superficie de se ha revelado como un parámetro crítico a la hora de llevar a cabo esta estrategia de inmovilización. Se logrado controlar la densidad superficial a través de la formación de SAMs mixtas de tioles funcionalizados y tioles separadores. El mejor funcionamiento se ha alcanzado utilizando una SAM mixta con una fracción molar de tioles funcionalizados de 0,02. Estos resultados están en consonancia con algunos estudios previos que demuestran que un empaquetamiento demasiado alto de las moléculas de biotina es menos efectivo para el acoplamiento de la estreptavidina. El elevado nivel de control sobre las propiedades de la superficie que proporciona la química de las SAM ha permitido controlar adecuadamente este factor tan crítico.

Utilizando las superficies funcionalizadas con anticuerpos en las condiciones resultantes, se ha podido detectar la interacción del antígeno específico correspondiente. De esta forma, se han alcanzado niveles de concentración del orden de ng/mL, lo que es equivalente a un intervalo de 100 – 200 pM.

La posibilidad de llevar a cabo la determinación de las hormonas incluidas en este estudio; hGH, hFSH, hLH y hTSH; y de otras hormonas relacionadas, como la hCG con un mismo dispositivo convierte al biosensor SPR en un valioso instrumento de análisis POC portátil para el control de la fertilidad y el diagnóstico y seguimiento de enfermedades relacionadas con la tiroides y la pituitaria y desórdenes reproductivos o del crecimiento. El dispositivo puede funcionar de forma análoga para la determinación

de otros analitos de interés clínico en fluidos biológicos y para el seguimiento de marcadores proteicos de enfermedades.

Líneas futuras

Aunque en los últimos años se ha llevado a cabo un enorme esfuerzo en el desarrollo de dispositivos biosensores para el diagnóstico clínico, esta tecnología aún tiene un largo camino que recorrer para alcanzar las necesidades específicas de un análisis POC. Las siguientes generaciones de biosensores deben permitir:

- la detección simultánea de múltiples sustancias, que permitan obtener un perfil de concentraciones para llevar a cabo el diagnóstico molecular de enfermedades como algunos tipos de cánceres o enfermedades degenerativas.
- la medida en muestras complejas como el suero, la orina, saliva e incluso en tejidos, con una especificidad adecuada
- la detección de las concentraciones extremadamente bajas a las que se encuentran algunos biomarcadores (10^{-12} M - 10^{-15} M) mediante sensores ultrasensibles
- la fabricación en gran volumen de dispositivos robustos, fiables, simples y de bajo coste
- una detección rápida y en tiempo real, que permita al personal sanitario tomar decisiones instantáneas y llevar a cabo el seguimiento en continuo del paciente
- la miniaturización e integración de todas las fases del proceso analítico en un solo dispositivo cuyo reducido tamaño permita su uso de forma portátil en cualquier localización
- la detección *in vivo*: el avance en sistemas integrados y miniaturizados puede facilitar el desarrollo de biosensores implantables e incluso inyectables que faciliten el seguimiento de las enfermedades

Este trabajo abre algunas líneas encaminadas a la mejora de los resultados obtenidos cuyo desarrollo puede permitir la fabricación de dispositivos para el análisis POC con unas características más avanzadas que permitan alcanzar los requerimientos mencionados:

- Utilización de transductores con una mayor sensibilidad que permitan alcanzar niveles de detección adecuados para algunas de las aplicaciones diagnósticas más exigentes. En nuestro grupo se dispone de una amplia experiencia en el desarrollo de transductores ópticos como el novedoso biosensor de resonancia de plasmón superficial magneto-óptica (MOSPR), biosensores de óptica integrada, como el interferómetro de Mach-Zehnder y biosensores nanomecánicos, que aunque se encuentran en fase de desarrollo, podrían permitir mejorar los niveles de sensibilidad alcanzados en este trabajo en un futuro próximo. Algunos de estos transductores pueden permitir la fabricación de dispositivos integrados y miniaturizados conocidos como laboratorio en un chip (Lab-on-a-chip) o ampliar enormemente el número de canales de medida. Los progresos en nanotecnología prometen revolucionar el campo de los biosensores con nuevos transductores con tamaños situados en la nanoescala, con altas sensibilidades, de bajo coste y con un elevado número de canales. Algunos de estos dispositivos incluyen nanopartículas, nanotubos de carbono, nanopalanca o puntos cuánticos.
- Desarrollo de nuevos elementos de reconocimiento: moléculas que presenten una mayor estabilidad de forma que proporcionen a los dispositivos una vida útil más larga o que presenten en su estructura grupos funcionales adecuados para facilitar su inmovilización orientada, como en el caso de los fragmentos de anticuerpos o anticuerpos modificados genéticamente.
- Mejora de la química de la interfase, que debe permitir la inmovilización de los elementos de reconocimiento en una densidad adecuada, con la orientación óptima y sin que la actividad biológica se vea afectada. Debido a que la adsorción inespecífica de proteínas es uno de los mayores problemas que afectan a la

estabilidad de los dispositivos, la investigación en superficies resistentes a este proceso puede mejorar notablemente su funcionamiento.

Más concretamente, centrándonos en la determinación de hormonas pituitarias, existen algunas aplicaciones interesantes que quedan abiertas para su estudio:

- La detección de hGH de origen recombinante, utilizada para aumentar el rendimiento deportivo, supone uno de los más recientes retos para las técnicas analíticas, ya que es prácticamente indistinguible de su correspondiente hormona endógena, por lo que se han realizado grandes esfuerzos para encontrar métodos analíticos que permitan su detección. La detección del dopaje con hGH se basa en la determinación de la relación de las concentraciones de las isoformas de 20 kDa y 22 kDa de ésta hormona en la circulación. Esta proporción se podría determinar utilizando un inmunosensor funcionalizado con el anticuerpo hGH-12, capaz de detectar todas las isoformas de la hGH, con un formato de inmunoensayo de tipo sándwich, utilizando posteriormente anticuerpos secundarios específicos de cada isoforma de la hormona.
- La utilización de ensayos tipo sándwich, podría abrir la posibilidad de construir inmunosensores capaces de detectar varios analitos relacionados, además de proporcionar una amplificación de la señal, que permitiese detectar concentraciones del analito aún más reducidas. Un ejemplo de este tipo de aplicación sería un inmunosensor funcionalizado con el anticuerpo hCG-21, capaz de unirse a la hCG, hFSH, hLH y hTSH, permitiría llevar a cabo la detección de cualquiera de estas hormonas utilizando un anticuerpo secundario específico de cada una de ellas.

Publicaciones

Artículos:

- Trevino J., Calle A., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Lechuga L.M., *Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay*. Talanta, 2009 **78** (3): p. 1011-1016.
- Trevino J., Calle A., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Lechuga L.M., *Surface plasmon resonance immunoassay analysis of pituitary hormones in urine and serum samples*. Clinica Chimica Acta, 2009 **403** (1-2): p. 56-62
- Trevino J., Calle A., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Lechuga L.M., *Single and multi-analyte determination of gonadotropic hormones in urine by Surface Plasmon Resonance immunoassay*. Analytica Chimica Acta, In Press.

Actas de congresos:

- Carrascosa L.G., Treviño J., de Juan E., Calle A. and Lechuga L.M., *Real-time SPR biosensing for early clinical diagnostics*. Proceedings of the 6th Iberoamerican Congress on Sensors. 2008.

Contribuciones a congresos:

Presentaciones orales:

- Carrascosa L.G., Treviño J., de Juan E., Estevez M.C. and Lechuga L.M., *Surface Plasmon Resonance (Nano)Biosensors for early diagnostics*. VI Reunión Española de Optoelectrónica. Optoel. 2009. Málaga.
- Carrascosa L.G., Treviño J., de Juan E., Estevez M.C. and Lechuga L.M., *Surface Plasmon Resonance (Nano)Biosensors for early diagnostics*. II Jornadas Anuales CIBER-BBN. 2009. Zaragoza.
- Treviño J., Carrascosa L.G., de Juan E., Calle A. and Lechuga L.M., *Real-time SPR biosensing for early clinical diagnostics*. 6º Congreso Iberoamericano sobre Sensores. Ibersensors 2008. Sao Paulo. Brasil.

Posters:

- Trevino J., Calle A., Rodriguez-Frade J.M., Mellado M., Lechuga L.M., *Detection of human growth hormone by surface plasmon resonance immunoassay*. Europtrode. 2006. Tubingen. Alemania
- Moreno M., Carrascosa L.G., Álvarez M., Sánchez del Río J., Sepúlveda B., Mauriz E., Treviño J., Calle A. and Lechuga L.M. *Nanobiosensor devices for early detection of cancer and infectious agents*. Ochoa, 100 años: mirando al futuro. Madrid. 2005